

**POTENSI EKSTRAK ETANOL TANAMAN PEGAGAN
(*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI SOD DAN
NRF-2 DENGAN METODE IMMUNOHISTOKIMIA
PADA JARINGAN TESTIS TIKUS PUTIH
(*Rattus norvegicus*) USIA TUA**

SKRIPSI

Oleh:

GRAHADENATA HANA PUTRA
145130101111060



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**POTENSI EKSTRAK ETANOL TANAMAN PEGAGAN
(*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI SOD DAN
NRF-2 DENGAN METODE IMMUNOHISTOKIMIA
PADA JARINGAN TESTIS TIKUS PUTIH
(*Rattus norvegicus*) USIA TUA**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

**GRAHADENATA HANA PUTRA
145130101111060**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi SOD dan NRF-2 dengan Metode Immunohistokimia Pada Jaringan Testis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Usia Tua

Oleh :
Grahadenata Hana Putra
145130101111060

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 07 Agustus 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Agung P. Warih Marhendra, M.Si
NIP. 19650616 199111 1 001

Drh. Fajar Shodiq P., M. Biotech
NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Grahadenata Hana Putra

NIM : 145130101111060

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

**Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)
Terhadap Ekspresi SOD dan NRF-2 dengan Metode
Immunohistokimia Pada Jaringan Testis Tikus Putih (*Rattus
norvegicus*) Usia Tua**

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 07 Agustus 2018
Yang menyatakan,

Grahadenata Hana Putra
NIM.145130101111060

Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi SOD dan NRF-2 dengan Metode Immunohistokimia Pada Jaringan Testis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Usia Tua

ABSTRAK

Proses penuaan yang alami diakibatkan karena usia makhluk hidup yang bertambah. Penuaan terjadi karena proses fisiologis setiap makhluk hidup yang dimulai sejak lahir. Proses fisiologis tersebut mengakibatkan penurunan fungsi dari mitokondria dan menurunkan biogenesis dari mitokondria. Kondisi tersebut menyebabkan terakumulasinya ROS, dan merangsang aktivasi Nrf2 (*Nuclear erythroid-related factor-2*). Ekstrak etanol tanaman pegagan *Centella asiatica* mengandung senyawa flavonoid yang berfungsi untuk mempercepat aktivasi Nrf2 dan menekan produksi dari ROS dengan memproduksi SOD (*Superoxyde dismutase*). Penelitian ini menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* (SD) berusia 2 tahun dengan berat badan sekitar 300 gram yang dibagi menjadi empat kelompok, yaitu : kelompok kontrol positif, kelompok yang diberi ekstrak etanol *Centella asiatica* sebanyak 1 ml dengan dosis 100 mg/kg BB, kelompok yang diberi ekstrak etanol *Centella asiatica* sebanyak 1 ml dengan dosis 200 mg/kg BB, dan kelompok yang diberi ekstrak etanol *Centella asiatica* sebanyak 1 ml dengan dosis 300 mg/kg BB. Parameter yang diamati adalah ekspresi SOD dan Nrf2 melalui pewarnaan Immunohistokimia (IHK) data ekspresi dianalisis secara statistik dengan *one-way* ANOVA, $\alpha=0,05$. Didapatkan bahwa terjadi peningkatan ekspresi Nrf2 dan SOD setelah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan. Dosis terbaik yang didapatkan untuk meningkatkan ekspresi SOD dan NRF2 adalah pada dosis 200mg/Kg BB.

Kata kunci: Penuaan, Ekstrak etanol *Centella asiatica*, Superoxide Dismutase (SOD), *Nuclear factor-erythroid related factor-2* (Nrf2)

**Study of *Centella asiatica* With Ethanol Extract on SOD and NRF-2
Expression with Immunohistochemical Method On Old
White Rat (*Rattus norvegicus*) Testes Tissue**

ABSTRACT

The natural process of aging is due to the increasing age of living creatures. Aging occurs because of the physiological process of every living being that begins at birth. Such physiological processes result in decline of mitochondrial function. These conditions cause the accumulation of ROS, activate Nrf2 (Nuclear erythroid-related factor-2). The ethanol extract of *Centella asiatica* plant contains flavonoid compound which serves to accelerate the activation of Nrf2 and suppress the production of ROS with produce SOD (Superoxide dismutase). This study used a 2-year old *Sprague dawley* (*Rattus norvegicus*) male rats weighing about 300 grams divided into four groups: positive control group, ethanol extract of *Centella asiatica* 1 ml with dose of 100 mg / kg BW, the group extracted *Centella asiatica* ethanol extract as much as 1 ml with a dose of 200 mg / kg BW, and the group given ethanol extract *Centella asiatica* as much as 1 ml with a dose of 300 mg/kg BW. The parameters observed were the expression of SOD and Nrf2 through Immunohistochemical Immunization (IHK) expression data were analyzed statistically with one-way ANOVA, $\alpha = 0.05$. The result is showing that ethanol extract of *Centella asiatica* increase SOD and NRF2 expression. The best dosage on this study on 200 mg/KgBB.

Key word: Aging, Ethanol Extract *Centella asiatica*, Superoxide Dismutase (SOD), Nuclear factor-erythroid related factor-2 (Nrf2)

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan berkat dan anugerah-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi SOD dan NRF-2 dengan Metode Immunohistokimia Pada Jaringan Testis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Usia Tua” ini dapat terselesaikan.

Selama menyusun skripsi, penulis banyak mendapatkan arahan, bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Dr. Agung P. Warih Marhendra, M.Si selaku dosen pembimbing I dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
2. Drh. Fajar Shodiq P., M. Biotech selaku dosen pembimbing II yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh, DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
4. Wibi Riawan S. Si. M. Biomed dan Drh. Desi Wulansari, M. Vet selaku dosen penguji yang telah memberikan saran, kritik, masukan serta dukungan kepada penulis dalam penyempurnaan skripsi ini.
5. Keluarga penulis, Ayah Sutrisno, Ibu Nik Haya, Kakak Masyudi Hana Putra dan Herdhiana Hana Putri, yang selalu memberi kasih sayang, dorongan dan dukungan untuk menyelesaikan skripsi serta perhatiannya akan kebutuhan saya baik secara moril maupun materi.
6. Shanti K. Nadhilah dan keluarga yang selalu memberi perhatian, dukungan dan motivasi untuk segera menyelesaikan skripsi tanpa kenal lelah.

7. Teman sejawat dalam pelaksanaan penelitian ini “Esti, Ganang, Aldi, Risa dan Bay” yang bekerjasama dengan baik, serta selalu memberikan dukungan yang tak henti-henti.
8. Keluarga Kontrakan Avengers “Aldi, Febry, Dendot, Adi, dan Bay” yang selalu menggoda dan mendukung dalam penyelesaian skripsi ini.
9. Teman-teman TKP khususnya Kama, Mila, Jo, Ida, Nana, Alita, Fajar, Wildan yang selalu mendukung penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
10. Teman-teman Brawijaya Kaisers yang selalu memberikan keceriaan, menghilangkan rasa galau dan mendukung penulis menyelesaikan skripsi dengan tepat waktu.
11. Teman-teman Lobster Spartan yang selalu memberikan semangat dan keceriaan dalam setiap usaha untuk menyelesaikan skripsi ini.

Akhir kata, penulis berharap semoga ALLAH S.W.T. membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan hasil dari penelitian ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

Malang, Agustus 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	4
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	 5
2.1 Penuaan	5
2.1.1 Tahap Proses Penuaan	6
2.1.2 Teori Penuaan	7
2.2 Perubahan Fisiologis Usia Lanjut	8
2.3 Mitokondria	9
2.4 Tanaman Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	10
2.4.1 Kandungan Tanaman Pegagan	12
2.4.2 Tanaman Pegagan sebagai Antioksidan	12
2.5 Hewan coba tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	14
2.5.1 Konversi Umur Tikus	16
2.6 Superoxyde Dismutase (SOD)	17
2.7 <i>Nuclear factor-erythroid related factor-2</i> (Nrf2)	19
2.8 Testis	20
2.9 Spermatogenesis	22
2.8.1 Pengertian Spermatogenesis	22
2.8.2 Proses Spermatogenesis	23
2.8.3 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Spermatogenesis	25
 BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	 26
3.1 Kerangka Konseptual	26
3.2 Hipotesis Penelitian	28

BAB 4 METODE PENELITIAN	29
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	29
4.2 Sampel Penelitian	29
4.3 Rancangan Penelitian	30
4.4 Variabel Penelitian Penelitian	30
4.5 Materi Penelitian.....	31
4.5.1 Alat	31
4.5.2 Bahan	31
4.6. Tahapan Penelitian.....	31
4.6.1 Preparasi Hewan Coba.....	31
4.6.2 Pembuatan Ekstrak Etanol <i>Centella asiatica</i>	32
4.6.3 Pemberian Ekstrak Etanol <i>Centella asiatica</i> pada Hewan Coba	33
4.6.4 Pengambilan Sampel Organ Testis.....	33
4.6.5 Pembuatan Preparat Histologis Jaringan Testis.....	33
4.6.6 Analisis Ekspresi SOD pada Jaringan Testis dengan Metode IHK.....	34
4.6.7 Analisis Ekspresi SOD pada Jaringan Testis dengan Metode IHK	36
4.6.8 Analisis Data.....	38
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	39
5.1 Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) Terhadap Ekspresi <i>Nuclear erythroid related factor-2</i> (Nrf2)	39
5.2 Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) Terhadap Ekspresi <i>Superoxyde Dismutase</i> (SOD)	43
BAB 4 PENUTUP.....	48
6.1 Kesimpulan.....	48
6.2 Saran	48
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN.....	54

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Kandungan Nutrisi Pegagan.....	12
2.2 Data Biologi Tikus	16
2.3 Hubungan Antara Umur Tikus dan Umur Manusia.....	17
4.1 Kelompok Perlakuan Pada Penelitian	30
5.1 Hasil Uji Tukey Terhadap Ekspresi Nrf2.....	41
5.1 Hasil Uji Tukey Terhadap Ekspresi SOD	45



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tanaman Pegagan (<i>Centella asiatica</i>).....	11
2.2 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	14
2.3 Anatomi Testis.....	21
2.4 Proses Spermatogenesis.....	23
3.1 Kerangka konsep penelitian.....	26
5.1 Gambaran ekspresi Nrf2 Jaringan Testis dengan Metode Immunohistokimia perbesaran 1000x.....	40
5.2 Gambaran ekspresi SOD Jaringan Testis dengan Metode Immunohistokimia perbesaran 1000x.....	44



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Skema Penelitian.....	54
2 Pembuatan Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan	55
3 Perhitungan Dosis Terapi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan.....	56
4 Pembuatan Preparat Histopatologi Testis	58
5 Metode Imunohistokimia	59
6 Determinasi Tanaman Pegagan	60
7 Laik Etik.....	61
8 Uji ANOVA Nrf2.....	62
9 Uji ANOVA SOD	65



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Ab	: Antibodi
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
AOAC	: <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BB	: Berat Badan
BW	: Body Weight
DNA	: <i>Deoxyribonucleid Acid</i>
SOD	: <i>Superoxyde Dismutase</i>
Nrf2	: <i>Nuclear factor-erythroid factor-2</i>
g	: gram
IHK	: Imunohistokimia
kg	: kilogram
KP	: Kontrol Positif
mg	: miligram
mL	: mililiter
NaCl	: <i>Natrium Chloride</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
PBS	: <i>Phospat Buffered Saline</i>
Ph	: <i>potential of hydrogen</i>
PO	: Per Oral
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SD	: <i>Sprague dawley</i>
TEM	: <i>Transmission Electron Microscopy</i>
TLC	: <i>Thin Layer Chromatography</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Penuaan merupakan proses alami pada tubuh setiap individu dan merupakan suatu tahap kehidupan yang tidak dapat terelakkan oleh makhluk hidup. Hewan yang mengalami penuaan tidak jauh berbeda dengan yang dialami manusia. Pada dewasa ini masyarakat disajikan dengan berbagai isu yang berkembang tentang hewan-hewan yang terancam punah di alam. Penuaan dengan keterbatasan jumlah populasi di alam akan membuat manusia berupaya keras untuk mempertahankan spesies hewan yang akan mengalami kepunahan dengan upaya konservasi.

Proses penuaan pada makhluk hidup mengakibatkan perubahan struktur dan fungsi sel. Penuaan juga mengakibatkan berkurangnya kemampuan jaringan secara perlahan untuk memperbaiki atau mengganti diri dan mempertahankan struktur, serta fungsi normal (Chunningham, 2003). Kondisi tersebut akan berpengaruh pada performa sistem reproduksi hewan menjadi kurang optimal.

Diupayakan untuk setiap hewan tetap memproduksi secara optimal meskipun telah mengalami penuaan secara fisiologis. Dengan meningkatnya usia, terjadi perubahan struktural dan fungsi pada tingkat sel, jaringan maupun organ. Menurut Chunningham (2003), perubahan struktural maupun fungsi tersebut mengakibatkan terganggunya segala proses fisiologis normal salah satunya adalah pada metabolisme maupun pada proses mutasi DNA. Kondisi tubuh yang mengalami penuaan fisiologis akan mengalami hambatan pada

metabolisme dalam mitokondria sehingga ROS yang dihasilkan semakin meningkat.

Zat antioksidan yang banyak digunakan dan bermanfaat yaitu salah satunya adalah flavonoid. Antioksidan ini banyak terdapat pada berbagai tanaman di Indonesia. Flavonoid dapat berfungsi sebagai penangkal radikal bebas pada tubuh serta sebagai sitoprotektif sel. Pegagan merupakan salah satu tanaman yang mengandung antioksidan flavonoid tersebut (Gupta dan Kumar, 2006).

Penelitian ini diharapkan dapat mengetahui potensi ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat mempercepat reaksi yang mengaktivasi Nrf2 untuk menghasilkan enzim SOD untuk menangkal radikal bebas. Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) kemudian mengetahui ekspresi SOD dan Nrf2 diukur dengan metode Imunohistokimia (IHK).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Apakah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat berpengaruh pada ekspresi SOD pada jaringan testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua ?
2. Apakah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat berpengaruh pada ekspresi NRF-2 pada jaringan testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua ?

1.3 Batasan Masalah

Batasan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) sejumlah 20 ekor dengan usia 2 tahun serta memiliki berat badan 300 gram
2. Dosis pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebanyak 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, 300mg/kgBB yang diberikan secara peroral selama 21 hari.
3. Volume pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) yang diberikan sebanyak 1 mL selama 21 hari yang diberikan secara peroral (PO) sesuai dengan kelompok perlakuan.
4. Pembacaan ekspresi SOD dan Nrf2 dianalisa dengan metode Imunohistokimia (IHK). Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya dengan 20 lapang pandang, dengan pembesaran 1000x dan dihitung manual dengan melihat area ekspresi yang terwarnai coklat.
5. Analisa hasil melalui perhitungan manual yang dianalisis dengan ANOVA menggunakan Microsoft Office Excel dan SPSS untuk Windows dengan $\alpha=0,05$.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi SOD pada jaringan testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua.

2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat mempercepat peningkatan ekspresi Nrf2 pada jaringan testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua.

1.5 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diharapkan oleh penulis dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Penelitian ini dapat digunakan sebagai kajian ilmiah pemanfaatan tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebagai antioksidan untuk menangkal radikal bebas akibat penuaan atau *aging* dan sebagai profertilitas untuk menyuburkan produk spermatozoa.
2. Penelitian ini dapat digunakan sebagai literatur pemanfaatan tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebagai antioksidan dan profertilitas dalam dunia kedokteran hewan.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penuaan

Proses penuaan merupakan berkurangnya kemampuan jaringan secara perlahan-lahan untuk memperbaiki atau mengganti diri dan mempertahankan struktur, serta fungsi normalnya (Chunningham, 2003). Dengan semakin bertambahnya usia, maka akan terjadi penurunan berbagai fungsi organ tubuh dan terjadinya perubahan fisik, dari tingkat seluler, organ, hingga sistem karena proses penuaan.

Menurut (Wasilah dan Soedjono, 2001) tua merupakan suatu keadaan yang dipandang dari tiga sisi, yaitu sisi kronologis, fisiologis, dan psikologis. Sesuatu dianggap tua atau dipandang tua apabila dinyatakan telah berumur lama. Menurut (WHO) memberi definisi bahwa seseorang disebut tua atau lanjut usia lanjut apabila berdasar kronologis telah berumur 65 tahun atau lebih. Seseorang yang belum berumur 65 tahun tetapi tampak setua usia 65 tahun karena stres emosional, maka orang tersebut masuk dalam definisi tua psikologis. Sedangkan apabila seseorang tampak tua akibat menderita suatu penyakit kronik maka dapat digolongkan dalam tua fisiologis.

Menurut (Soejono, 2004) Proses penuaan pada pria pejalan tidak menyebabkan berubahnya ukuran dan berat testis, tetapi sel yang memproduksi dan memberi nutrisi yaitu sel Leydig pada sperma akan berkurang. Penurunan jumlah dan aktivitas sel Leydig menyebabkan sperma berkurang hingga 50% dan testosteron juga mengalami penurunan. Hal ini menyebabkan penurunan libido dan kegiatan seksual pada pejalan usia tua.

2.1.1 Tahap Proses Penuaan

Karakteristik penuaan ditandai dengan kegagalan tubuh dalam mempertahankan homeostasis tubuh terhadap suatu stres walaupun stres tersebut masih dalam batas fisiologis. Kegagalan tersebut akan menurunkan ketahanan tubuh untuk hidup dan mengakibatkan meningkatnya kerusakan pada suatu individu. Tiga fakta yang penting dalam kondisi biologis penuaan yang bersifat universal yaitu menurunnya fungsi sel, kemudian organ, dan selanjutnya adalah organismenya tetapi tidak menyebabkan berhentinya suatu fungsi (Wasilah dan Soedjono, 2001).

Proses menua memiliki tiga tingkatan hingga terjadinya kecacatan atau kerusakan. Kerusakan yang pertama terjadi pada tingkat sel, kedua pada tingkat jaringan, dan yang terakhir pada tingkat organ. Soekaton (1985) mengatakan bahwa tua bukanlah suatu penyakit. Hal tersebut sebenarnya sudah diketahui sejak lima belas abad yang lalu bahwa tua bukan merupakan suatu penyakit oleh karena itu tidak ada obatnya.

Perubahan fisik karena perubahan komposisi tubuh yang menyertai pertambahan umur umumnya bersifat fisiologis, seperti turunnya tinggi badan, berat badan, daya lihat, kekuatan otot, daya dengar, kemampuan tubuh terhadap berbagai rasa, toleransi tubuh terhadap glukosa, dan berbagai fungsi otak. Pada sistem kardiovaskular, kekuatan otot jantung menurun, sedangkan tahanan perifer meningkat karena arteriosklerosis. Perubahan-perubahan yang terjadi akan berlanjut secara progresif dan menimbulkan berbagai gangguan seperti gangguan pada metabolisme mitokondria, kemudian menjadi

ketidakmampuan sel untuk menangkal radikal bebas yang berlanjut menjadi disfungsi sel. Seringkali proses tersebut mengarah pada suatu penyakit (Wasilah dan Soedjono, 2001).

2.1.2 Teori Penuaan

Teori pokok dari penuaan terdiri dari 5 teori (Wasilah dan Soedjono, 2001), sebagai berikut :

1. Teori Radikal Bebas

Teori ini mengemukakan bahwa produk samping metabolisme oksidatif yang sangat reaktif dapat bereaksi dengan unsur-unsur sel utama, termasuk protein, DNA, dan lipid untuk menghasilkan molekul-molekul disfungsional yang mengganggu fungsi sel.

2. Teori Endokrin

Teori ini mengatakan bahwa proses menjadi tua diatur oleh *pace maker*, seperti kelenjar timus, hipotalamus, hipofise, dan tiroid yang menghasilkan hormon-hormon, dan secara berkaitan mengatur keseimbangan hormonal dan regenerasi sel-sel tubuh manusia. Proses penuaan terjadi akibat perubahan keseimbangan sistem hormonal atau penurunan produksi hormon-hormon tertentu (Chunningham,2003).

3. Teori Replikasi DNA

Teori ini mengatakan bahwa proses penuaan merupakan akumulasi bertahap kesalahan dalam masa replikasi DNA, sehingga terjadi kematian sel. Kerusakan DNA akan menyebabkan pengurangan kemampuan replikasi *ribosomal DNA* (rDNA) dan mempengaruhi masa

hidup sel. Sekitar 50% rDNA akan menghilang dari sel jaringan pada usia kira-kira 70 tahun (Chunningham,2003).

4. Teori Rantai Silang

Teori rantai silang mengatakan bahwa akibat dari terjadinya ikatan silang yang progresif antara protein-protein intraseluler dan interseluler serabut-serabut kolagen. Ikatan silang meningkat sejalan dengan bertambahnya umur. Hal ini mengakibatkan penurunan elastisitas dan kelenturan kolagen di membran basalis atau di substansi dasar jaringan penyambung. Keadaan ini akan mengakibatkan kerusakan fungsi organ (Chunningham,2003).

5. Teori Mutasi DNA Mitokondria

Teori ini mengatakan bahwa perubahan mitokondria diduga mempengaruhi proses penuaan. Kerusakan pada mitokondria dapat mengurangi pasokan energi sampai 80%. Terjadi mutasi random mtDNA di berbagai jaringan. Mutasi ini berakumulasi di jaringan-jaringan menurut umur, laju mutasi, bersifat spesifik jaringan dan spesifik spesies, dan berbagai penyakit tua berkorelasi dengan adanya mutasi mtDNA (Wasilah dan Soedjono, 2001).

2.2 Perubahan Fisiologis Usia Lanjut

Proses penuaan mempengaruhi berbagai kondisi tubuh. Perubahan fisiologis suatu makhluk hidup mengalami suatu penurunan bahkan kehilangan fungsi. Secara progresif pada penuaan daya tahan terhadap infeksi dan akan menumpuk makin banyak sampah metabolik. Tidak terkecuali akan

mempengaruhi jantung dan pembuluh darah mengalami perubahan struktural maupun fungsional. Perubahan tersebut berlangsung secara perlahan dan lambat tanpa disadari. Perubahan fisik karena perubahan komposisi tubuh umumnya bersifat fisiologis, seperti turunnya tinggi badan, berat badan, kekuatan otot, daya lihat, daya dengar, kemampuan berbagai rasa (senses), toleransi tubuh terhadap glukosa, dan berbagai fungsi otak (Wasilah dan Soedjono, 2001).

Penurunan berbagai fungsi sel pada proses penuaan tersebut yang nantinya akan mengakibatkan reaksi domino kepada semua reaksi yang ada pada tubuh. Perubahan tersebut termasuk pada metabolisme mitokondria yang mengakibatkan terganggunya transpor elektron yang mengakibatkan akumulasi produksi dari ROS (Susmiarsih, 2010)

2.3 Mitokondria

Mitokondria merupakan organel sel. Mitokondria diketahui ditemukan pada lebih dari satu juta tahun yang lalu pada bakteri yang berkerabat dekat dengan alfa proteobakteri dan masuk pada sel eukariot. Mitokondria merupakan struktur terbesar dalam sitoplasma sel. Jumlah mitokondria pada sel bervariasi tergantung kebutuhan sel pada energi. Struktur mitokondria masing-masing mempunyai ciri yang berbeda-beda. Mitokondria tersusun atas dua membran yaitu membran luar dan dalam yang masing-masing merupakan lapisan lipoprotein. Komponen rantai pernapasan yang berhubungan dengan fosforilasi oksidatif terdapat dalam membran dalam mitokondria (Susmiarsih, 2010).

Mitokondria sering disebut sebagai penghasil energi pada sel. Enzim oksidatif pada membran dalam dan enzim siklus asam sitrat dalam matriks

mitokondria bersama-sama akan mengoksidasi residu asetil sehingga terbentuk karbondioksida dan air. Energi yang dihasilkan tersebut dapat digunakan untuk mensintesis bahan berenergi yang sangat tinggi yaitu adenosin trifosfat (ATP). ATP ini yang selanjutnya dikeluarkan dari mitokondria ke sitosol untuk digunakan oleh sel sebagai sumber energi (Guyton, 1996).

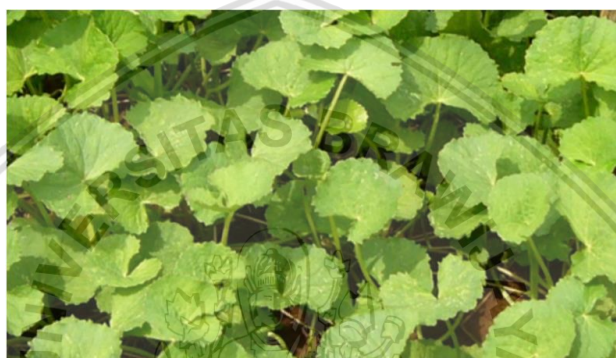
Akibat defisiensi tersebut menimbulkan peningkatan ROS (*reactive oxygen species*) dan nitrogen reaktif yang dapat meningkatkan kerusakan oksidatif pada lipid, protein, dan DNA. Dalam metabolisme normal, molekul-molekul oksigen reaktif yang tereduksi dihasilkan dalam jumlah kecil sebagai produk sampingan respirasi mitokondrial. Sel memiliki mekanisme pertahanan untuk mencegah kerusakan akibat molekul ini, yang dikenal sebagai sistem antioksidan (Rahmawati, 2014).

2.3 Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)

Centella asiatica atau yang biasa disebut tanaman pegagan merupakan tanaman obat tropis yang berasal dari kawasan negara-negara tropis. Di Indonesia tanaman ini banyak ditemukan pada pulau Jawa, Madura, Padang, Bali, Aceh, Makassar, dan Papua. Tanaman pegagan tumbuh liar pada tempat lembab yang subur. Tanaman ini cocok hidup di tepi parit, tepi jalan, diantara batu-batu, dan padang rumput (DepKes RI, 1977).

Tanaman pegagan ini memiliki panjang antara 10-80cm, batang dari tanaman ini berupa stolon yang menjalar di atas permukaan tanah, terdiri atas 2-10 daun yang merupakan daun tunggal yang tersusun dalam roset dan terkadang agak berambut. Daunnya berbentuk seperti ginjal, lebar, bundar dan tepi daun

beringgit sampai dengan bergerigi serta memiliki tangkai daun yang panjangnya mencapai 50mm. Bunga yang tumbuh antara 3-5 bunga. Mahkotanya berwarna merah lembayung serta tanaman ini memiliki buah pipih dengan tinggi 3mm dan lebar 7mm. Mempunyai dinding yang agak tebal, berlekuk dua, memiliki rusuk dan mempunyai warna kuning kecoklatan (DepKes, 1977).



Gambar 2.1. Tanaman pegagan (*Centella asiatica*) (Sutardi, 2008).

Berdasarkan deskripsi yang telah diuraikan, berikut adalah klasifikasi dari tanaman pegagan (Lasmadiwati, 2004) :

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Sub-divisi : Angiospermae
Kelas : Dikotyledonae
Ordo : Umbelliferae
Famili : Apiaceae
Genus : *Centella*
Spesies : *Centella asiatica*

1.2.1 Kandungan Tanaman Pegagan

Menurut Gupta dan Kumar (2006), kandungan bahan aktif yang ditemukan pada tanaman pegagan antara lain triterpenoid, genin, minyak essensial, flavonoid, fitosterol dan bahan aktif lainnya. Bahan-bahan aktif yang tersebut umumnya terdapat pada daunnya tepatnya pada jaringan palisade parenkim. Menurut Prabowo (2002), senyawa terpenting dari pegagan adalah triterpenoid yang dapat melancarkan aliran darah dalam pembuluh darah.

Tabel 2.1. Kandungan Nutrisi Pegagan

Kandungan Gizi	(%b/b)	(%b/k)	Literatur (%b/k)
Air	79,63		89,3 (%b/b)
Protein	4,58	22,5	14,95
Lemak	1,29	6,3	5,61
Abu	2,45	12	14,95
Karbohidrat	12,05	59,2	64,49
Asam asiatik	0,66	3,2	-
Vitamin C (mg)	79,14	388,5	-
β -karoten (ppm)	88,76	435,7	-
Fe (mg)	43,26	212,4	-
Ca (mg)	1994,28	9.790,30	-
Se (mcg)	4,55	22,3	-

Sumber: Pramono (1992); Arsyraf (2012)

1.2.2 Tanaman Pegagan sebagai Antioksidan

Tanaman pegagan mengandung salah satu antioksidan yang dibutuhkan oleh tubuh untuk menangkal radikal bebas yaitu Flavonoid. Flavonoid merupakan suatu kelompok senyawa fenol terbanyak di alam. Flavonoid memiliki fungsi sebagai antioksidan primer, *chelators* dan *superoxide anion scavenger* serta memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat dalam melawan *peroxy radicals*

dibandingkan dengan vitamin E dan vitamin C. Aktivitas antioksidan dari tanaman pegagan menunjukkan dapat mengurangi reduksi hidroperoksida, inaktivasi radikal bebas, *chelation* dari ion logam atau kombinasi ketiganya (Sutardi, 2016).

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. Berbagai jenis senyawa yang terkandung dan aktivitas antioksidatif flavonoid sebagai salah satu kelompok antioksidan alami yang terdapat pada sereal, sayur-sayuran dan buah. Kandungan flavonoid pada tanaman pegagan yaitu sebesar 13,69% yang telah di ekstrak menggunakan etanol 70% (Sugianto, dkk., 2013). Manfaat flavonoid antara lain untuk melindungi struktur sel, meningkatkan efektifitas vitamin C, antiinflamasi, mencegah keropos tulang dan sebagai antibiotik (Haris, 2011). Sedangkan efek farmakologi, telah dihubungkan dengan sifat antioksidan molekul ini, yaitu dapat menekan bentuk ROS dengan menghambat enzim, mencegah spesies radikal bebas khususnya *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan melindungi sel dari antioksidan yang bersifat radikal.

Senyawa isoflavon golongan flavonoid ekstrak etanol ekstrak tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mampu menginduksi protein mediator transkripsi gen yaitu Nrf2 dari membran sel yang nantinya akan mengaktifkan antioksidan SOD dan berfungsi dalam penetralan radikal bebas. Flavonoid mampu mencegah terjadinya peroksidasi lipid, meskipun belum mencukupi untuk melawan berlebihnya pembentukan radikal bebas (Sutardi, 2016).

Menurut Sastroamidjojo (1997), bioaktif flavonoid, tanin, steroid, dan glikosida berkhasiat untuk kesehatan sebagai metabolit sekunder. Triterpenoid glikosida termasuk golongan steroid yang merupakan bahan baku untuk sintesis hormon testosteron. Winarno (1997), menjelaskan triterpenoid glikosida dapat menghambat enzim yang mengkatalisa konversi androgen menjadi estrogen sehingga konsentrasi hormon testosteron meningkat. Hormon testosteron berfungsi untuk pematangan akhir spermatozoa. Selain mempengaruhi spermatogenesis, testosteron juga mengatur sifat-sifat seks sekunder, rangsangan seksual, perkembangan saluran-saluran kelamin dan kelenjar kelamin tambahan.

2.4 Hewan Coba Tikus

Hewan coba merupakan hewan yang dikembangbiakkan untuk digunakan sebagai hewan uji coba dari penelitian. Tikus seringkali digunakan pada berbagai macam penelitian medis selama bertahun-tahun. Hal ini dikarenakan tikus mudah berkembang biak, memiliki karakteristik yang unik, murah dan mudah didapatkan. Tikus termasuk golongan hewan yang beraktivitas di malam hari atau biasa disebut *nocturnal* (Wolfensohn dan Lloyd, 2013).



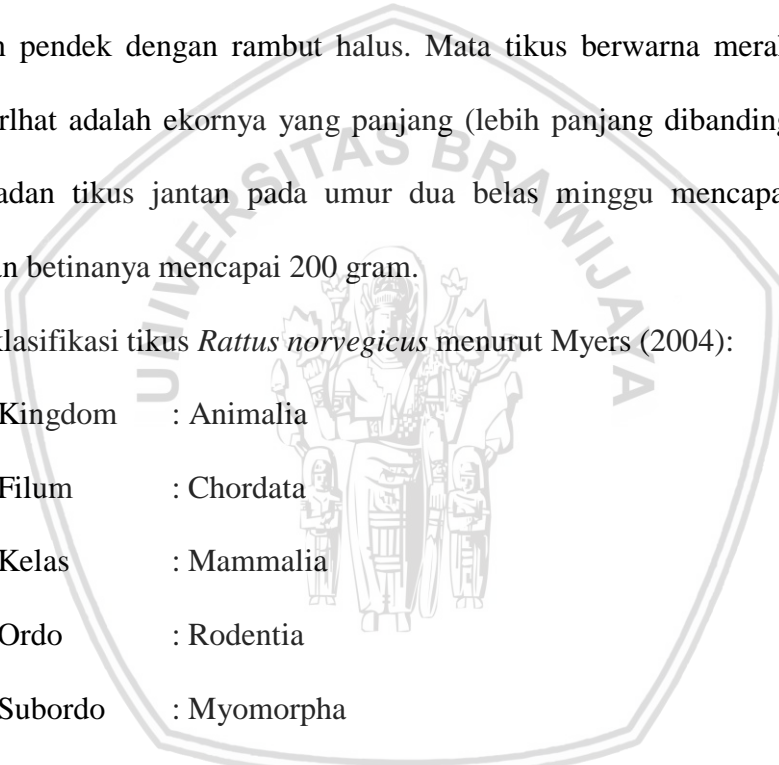
Gambar 2.2. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Akbar, 2010).

Tikus putih merupakan strain albino dari *Rattus norvegicus*. Tikus memiliki beberapa galur yang merupakan hasil pembiakan sesama jenis atau

persilangan. Selain *Wistar*, galur tikus yang sering digunakan pada penelitian adalah galur *Sprague dawley* (Inggris, 1980). Galur ini berasal dari peternakan *Sprague dawley*, Madison, Wincoustin.

Menurut Sirois (2005), tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* termasuk ke dalam hewan mamalia yang memiliki ekor panjang. Ciri-ciri galur ini yaitu bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit. Telinga tikus ini tebal dan pendek dengan rambut halus. Mata tikus berwarna merah. Ciri yang paling terlihat adalah ekornya yang panjang (lebih panjang dibandingkan tubuh). Bobot badan tikus jantan pada umur dua belas minggu mencapai 240 gram sedangkan betinanya mencapai 200 gram.

Berikut klasifikasi tikus *Rattus norvegicus* menurut Myers (2004):



Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Berat badan tikus jantan dewasa menurut Wolfenshon dan Lloyd (2013), yaitu 450-520 gram sedangkan betina memiliki berat 250-300 gram. Tikus jantan lebih berat dibandingkan tikus betina pada semua kelompok umur serta terjadinya perubahan berat organ (ginjal, hepar, pulmo, dan limpa), nilai hematologi, nilai

biokimia darah (SGOT dan SGPT) seiring dengan bertambahnya umur tikus. Kebutuhan makan dan minum masing-masing 5 hingga 10 gram per 100 gram berat badan dan 10 mililiter (ml) per 100 gram berat badan. Pakan yang diberikan pada tikus umumnya tersusun dari komposisi alami dan mudah diperoleh dari sumber daya komersial (Meetha, 2007).

Tabel 2.2. Data biologis tikus (Meetha, 2007)

Kriteria	Keterangan
Lama hidup	2-3 tahun
Lama produksi ekonomis	1 tahun
Umur disapih	21 hari
Umur dewasa	40-60 hari
Umur dikawinkan	10 minggu
Berat dewasa	300-400 gr jantan; 250-300 g betina
Berat lahir	5-6 g
Jumlah anak	rata-rata 9-20 ekor
Perkawinan kelompok	3 betina dengan 1 jantan
Kecepatan tumbuh	5 g/hari

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) banyak digunakan sebagai hewan coba karena mempunyai respon yang cepat serta dapat memberikan gambaran secara ilmiah yang mungkin terjadi pada manusia maupun hewan lain. Dalam kode etik penelitian kesehatan dicantumkan bahwa salah satu prinsip dasar riset biomedis dimana manusia sebagai subjek harus memenuhi prinsip ilmiah yang telah diakui dan harus didasarkan atas eksperimen laboratorium dan hewan percobaan yang memadai serta berdasarkan pengetahuan yang lengkap dari literatur ilmiah (Malole dan Pramono, 1989).

2.3.1 Konversi Umur Tikus

Menurut (Andreollo dkk., 2012) suatu perbandingan antara usia tikus dan manusia yaitu didapati bahwa masa kecil tikus lebih cepat dibandingkan dengan manusia. Tikus bertumbuh dengan cepat selama masa pertumbuhan dan matang secara seksual pada usia 6 minggu. Sedangkan manusia lebih lama yaitu mengalami masa pubertas pada usia 12-13 tahun. Pada usia dewasa masing-masing tikus perbulannya sama dengan dua setengah tahun dari manusia. Tikus betina mengalami menopause pada usia 15-18 bulan. Sedangkan manusia mengalami menopause pada usia 28 – 55 tahun (**Tabel 2.3**).

Tabel 2.3. Hubungan Antara Umur Tikus dan Umur Manusia
(Andreollo dkk., 2012).

Umur Tikus (bulan)	Umur Manusia (tahun)
6 bulan	18 tahun
12 bulan	30 tahun
18 bulan	45 tahun
24 bulan	60 tahun
30 bulan	75 tahun
36 bulan	90 tahun
42 bulan	105 tahun
45 bulan	113 tahun
48 bulan	120 tahun

2.5 Superoxyde Dismutase (SOD)

SOD merupakan metaloenzim yang dapat mengandung atom tembaga, seng, atau besi yang dibentuk dalam sitosol atau yang mengandung mangan yang dibentuk di dalam matriks mitokondria (Valko dkk., 2007). SOD merupakan antioksidan intraseluler utama dalam sel aerobik. SOD berada di otak, hepar, sel darah merah, tiroid, testis, otot jantung, mukosa lambung, kelenjar pituari,

pankreas, dan pulmo. Menurut Halliwell (2006), Kerja enzim ini mengkatalisis pemecahan anion superoksida menjadi oksigen dan hidrogen peroksida. Tingkat SOD antar individu relatif sama, hanya kapasitas induksi yang berbeda yaitu kemampuan tubuh untuk meningkatkan jumlah SOD ketika harus merespon naiknya jumlah radikal bebas dalam tubuh. Makin tua individu, makin turun juga kemampuan untuk menghasilkan SOD. SOD juga dikendalikan oleh gen mediator transkripsi yaitu *Nrf2*.

Pada manusia, ditemukan tiga bentuk SOD, yaitu *cytosolic* Cu,Zn-SOD, *mitochondrial* Mn-SOD, *extracellular* SOD (Mates dkk, 1999), sedangkan Fe-SOD umumnya ditemukan pada organisme prokariot. Enzim SOD tidak selalu bekerja bersama-sama, terkadang satu jenis enzim SOD berperan lebih dominan dibandingkan yang lainnya. CuZn-SOD terdapat di dalam sitosol berperan lebih dominan dibandingkan yang lainnya. CuZn-SOD terdapat di dalam sitosol berperan sebagai faktor pertahanan utama yang bertugas melindungi sel dari radikal superoksida. Mn-SOD lebih berperan dalam pertahanan sel dalam menghadapi stress etanol (Valko dkk., 2007).

Dalam melawan radikal bebas, kerja enzim SOD dibantu oleh enzim lain, yaitu katalase dan glutathione (GSH) peroksidase. Enzim SOD secara spontan merubah radikal $O_2^{\cdot -}$ menjadi H_2O_2 dan oksigen. Hidrogen peroksida yang dihasilkan masih cukup berbahaya sehingga perlu pengubahan lebih lanjut oleh katalase menjadi air dan oksigen. Glutathione peroksidase merupakan golongan enzim antioksidan yang mengandung selenium yang penting dalam memerangi hidroperoksida dan senyawa xenobiotik menjadi air dan alkohol. Dengan cara

tersebut kerusakan molekul-molekul penyusun sel akibat serangan radikal bebas dapat dihindari (Halliwell, 2006).

2.6 *Nuclear erythroid-related factor-2 (Nrf2)*

Peningkatan dari ROS menimbulkan berbagai kerusakan dan disfungsi dari jaringan dengan menyerang, mendenaturasi dan memodifikasi struktur dan fungsi molekul dan mengaktifkan faktor transkripsi yang sensitif redoks dan jalur transduksi sinyal. Hal ini mampu memicu terjadinya nekrosis, apoptosis, inflamasi, fibrosis. Sistem redoks termasuk antioksidan dan enzim detoksifikasi fase 2 akan melindungi jaringan dari kerusakan yang diakibatkan oleh ROS. Nrf2 berperan penting dalam aktivitas basal dan menginduksi gen-gen yang mengkode beberapa antioksidan dan enzim detoksifikasi fase 2 (Kamalia, 2016).

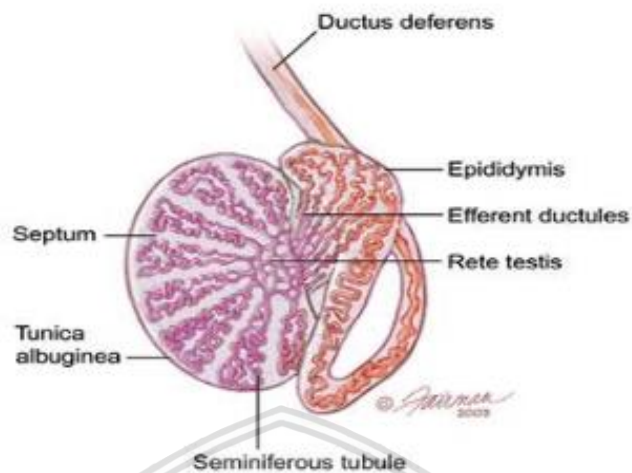
Nrf2 (*nuclear factor-erythroid-2 related factor 2*) merupakan aktor transkripsi yang mengatur gen yang mengkode antioksidan dan enzim detoksifikasi. Pada kondisi fisiologis, stres oksidatif akan memicu *up regulation* dari antioksidan endogen dan protein sitoprotektif untuk mencegah atau membatasi kerusakan jaringan. Proses ini diperantarai oleh aktivasi Nrf2 yang akan mengaktifasi laju transkripsi berbagai gen antioksidan dan enzim detoksifikasi (Kamalia, 2016).

Stres oksidatif seharusnya menyebabkan peningkatan aktivasi Nrf2. Dalam kondisi basal, Nrf2 berlokasi di sitoplasma dan inaktif, berikatan dengan molekul represor *kelch-like ECH association protein 1* (Keap1) membentuk kompleks Nrf2-Keap1. Keap1 terdiri dari beberapa residu sistein yang bertindak

sebagai sensor terhadap status redoks intraseluler. Nrf2 secara cepat akan didegradasi oleh jalur ubiquitin proteosom. Sinyal dari ROS dan elektrofil akan mengakibatkan disosiasi Nrf2 dari Keap1. Kemudian, Nrf2 akan bertranslokasi ke nukleus, di dalam nukleus, Nrf2 terikat pada sekuens regulator yang disebut *antioxidant response element* atau *electrophile response element* (ARE/EpRE) yang berlokasi di regio promotor dari gen yang mengkode antioksidan dan enzim detoksifikasi fase 2 (Li dkk., 2008).

2.7 Testis

Testis adalah organ reproduksi primer pada hewan / ternak jantan yang berfungsi sebagai penghasil benih (spermatozoa) dan sekaligus sebagai penghasil hormon jantan (Androgen). Karena menghasilkan sel, testes ini disebut memiliki fungsi sitogenik dan sebagai penghasil hormon disebut kelenjar endokrin. Testis ini jumlahnya sepasang yaitu bagian kanan dan kiri. Berdasarkan asalnya adalah gonad indeferen bagian medula pada saat fase embrio pada jantan. Alat ini berkembang dekat ginjal yaitu pada daerah krista genitalis primitif. Khususnya pada hewan atau ternak mamalia testis ini akan mengalami penurunan ke dalam skrotum pada akhir masa kebuntingannya. Sedangkan untuk ternak unggas testis ini akan tetap dipertahankan di dalam rongga perutnya yaitu di daerah asal pembentukannya. Menurut Leeson (1998), di dalam testis terdapat sel-sel Leydig yang terdapat pada jaringan interstitial yang akan menghasilkan hormon jantan (Androgen).



Gambar 2.3. Anatomi testis (Faranita, 2009).

Testis terdiri atas jaringan :

1. Tubulus seminiferus. Epitel tubulus terdiri dari dua macam sel yang berbeda, yaitu :

a. Sel sertoli adalah berbentuk panjang dan kadang-kadang seperti piramid. Sel ini terletak dekat atau diantara sel-sel germinatif. Sel ini bersifat fagosit karena mereka memakan sel-sel sperma yang telah mati atau yang telah mengalami degenerasi, selain dia sendiri memberi makan kepada sel-sel sperma yang masih muda (Junqueira, 2007).

b. Sel germinatif yang akan mengalami perubahan selama proses spermatogenesis, sebelum pembuahan (fertilisasi). Tingkat perkembangannya adalah mulai dari spermatogoni (sel paling muda) akan mengalami mitosis beberapa kali menjadi spermatosit primer. Spermatosit primer akan membagi diri menjadi spermatosit sekunder yang akan membagi dirinya lagi menjadi spermatid dan (Junqueira, 2007).

2. Sel stroma atau tenunan pengikat di luar tubulus seminiferus. Pada jaringan ini terdapat pembuluh darah, limfe, sel syaraf dan sel makrofag (Sukmaningsih, 2011).
3. Sel-sel interstitial dan sel-sel leydig. Sel leydig dapat menghasilkan hormon testosteron. Namun hormon testosteron ini juga dapat dihasilkan oleh ovarium dan kelenjar adrenal (Sukmaningsih, 2011).

2.8 Spermatogenesis

2.8.1 Pengertian Spermatogenesis

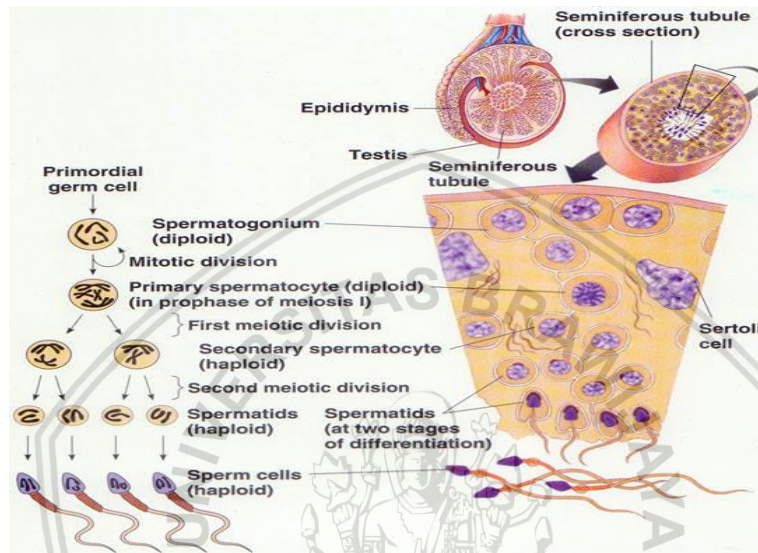
Spermatogenesis merupakan proses pembentukan dan pemasakan spermatozoa yang terjadi di tubulus seminiferus. Menurut Junqueira (2007), Spermatogenesis diatur oleh hormon gonadotropin dan testosteron. Peralihan dari bakal sel kelamin yang aktif membelah ke sperma yang masak serta menyangkut berbagai macam perubahan struktur yang berlangsung secara berurutan.

Dinding tubulus seminiferus terdiri dari jaringan epitel dan jaringan ikat, pada jaringan epithelium terdapat sel – sel spermatogonia dan sel sertoli yang berfungsi memberi nutrisi pada spermatozoa. Selain itu pada tubulus seminiferus terdapat pula sel leydig yang mengsekresikan hormon testosteron yang berperan pada proses spermatogenesis (Ganong, 2008).

Spermatogenesis mencakup pematangan sel epitel germinal melalui proses pembelahan dan diferensiasi sel, yang bertujuan untuk membentuk sperma fungsional. Pematangan sel terjadi di tubulus seminiferus yang kemudian disimpan di epididimis. Dinding tubulus seminiferus tersusun dari jaringan ikat

dan jaringan epitelium germinal yang berfungsi pada saat spermatogenesis. Pintalan-pintalan tubulus seminiferus terdapat di dalam ruang-ruang testis (lobulus testis) (Sukmaningsih, 2011).

2.8.2 Proses Spermatogenesis



Gambar 2.4 Proses Spermatogenesis (Sukmaningsih, 2011)

Pada waktu lahir tubulus seminiferus tidak berluken dan hanya ada dua jenis sel yaitu spermatogonia dan sel-sel indiferent. Selama pubertas tubulus seminiferus mulai berluken dan epitel kecambah berubah dari bentuk sederhana menjadi bentuk kompleks yang khas bagi hewan jantan dewasa (Sukmaningsih, 2011)

Sperma terbentuk di dalam tubulus seminiferus dari sel-sel induk sperma yang diploid, spermatogonia tipe A, yang terletak pada membran basalis. Spermatogenesis merupakan suatu proses kompleks yang meliputi pembelahan dan diferensial sel. Selama proses tersebut jumlah kromosom direduksi dari diploid ($2n$) menjadi haploid (n) pada setiap sel, juga terjadi reorganisasi

komponen-komponen inti sel dan sitoplasma secara meluas (Faranita, 2009). Spermatogenesis meliputi spermatositogenesis atau pembentukan spermatosit primer dan sekunder dari spermatogonium tipe A dan spermiogenesis atau pembentukan spermatozoa dari spermatid. Spermatositogenesis dikendalikan oleh FSH dari adenohipofisa dan spermiogenesis berada di bawah pengaruh LH dan testosteron.

Sel-sel kelamin jantan berkembang secara progresif dan bermigrasi dari membran basalis ke arah lumen tubulus seminiferus. Akan tetapi selama waktu tersebut mereka berhubungan dengan sitoplasma sel-sel sertoli yang memberi nutrisi kepada spermatozoa (Faranita, 2009).

Pada tikus, spermatogonium memiliki enam pembelahan mitosis. Setelah pembelahan tersebut spermatogonium akan berubah menjadi spermatosit prelepton. Kemudian spermatosit berkembang menjadi leptotene, zygotene, dan pakiten sebelum menjadi spermatosit sekunder. Masing-masing spermatosit membelah menjadi satu dari empat spermatid haploid, yang memasuki fase selanjutnya yaitu fase akrosom. Setelah itu selama akrosom mengalami perkembangan terjadi kondensasi inti dan perpanjangan yang diikuti oleh fase eliminasi dan pelepasan sitoplasma (Krinke, 2000).

Tikus memiliki 14 tahapan dalam proses spermatogenesis yang terjadi di dalam tubulus seminiferus. Tubulus seminiferus memiliki susunan ruas, dan setiap potongan melintang tubulus menunjukkan tahapan yang melibatkan empat atau lima generasi di sel germinal. Pada tikus dibutuhkan waktu 12 hari untuk menyelesaikan satu siklus yang terdiri dari 14 tahap. Spermatogonium tikus

membutuhkan empat siklus sampai mempunyai hasil akhir spermatozoa, sehingga diperlukan 48 hari untuk menyelesaikan seluruh tahapan spermatogenesis (Krinke, 2000).

Proses spermatogenesis meliputi perombakan radikal bentuk sel dimana sebagian besar sitoplasma termasuk asam ribonucleic (RNA), air, dan glikogen terlepas atau menghilang. Spermatid adalah suatu sel bundar yang relatif besar sedangkan spermatozoa merupakan suatu sel langsing memanjang yang kompak dan motil, dan terdiri dari kepala dan ekor (Faranita, 2009).

2.8.3 Faktor-faktor yang mempengaruhi spermatogenesis

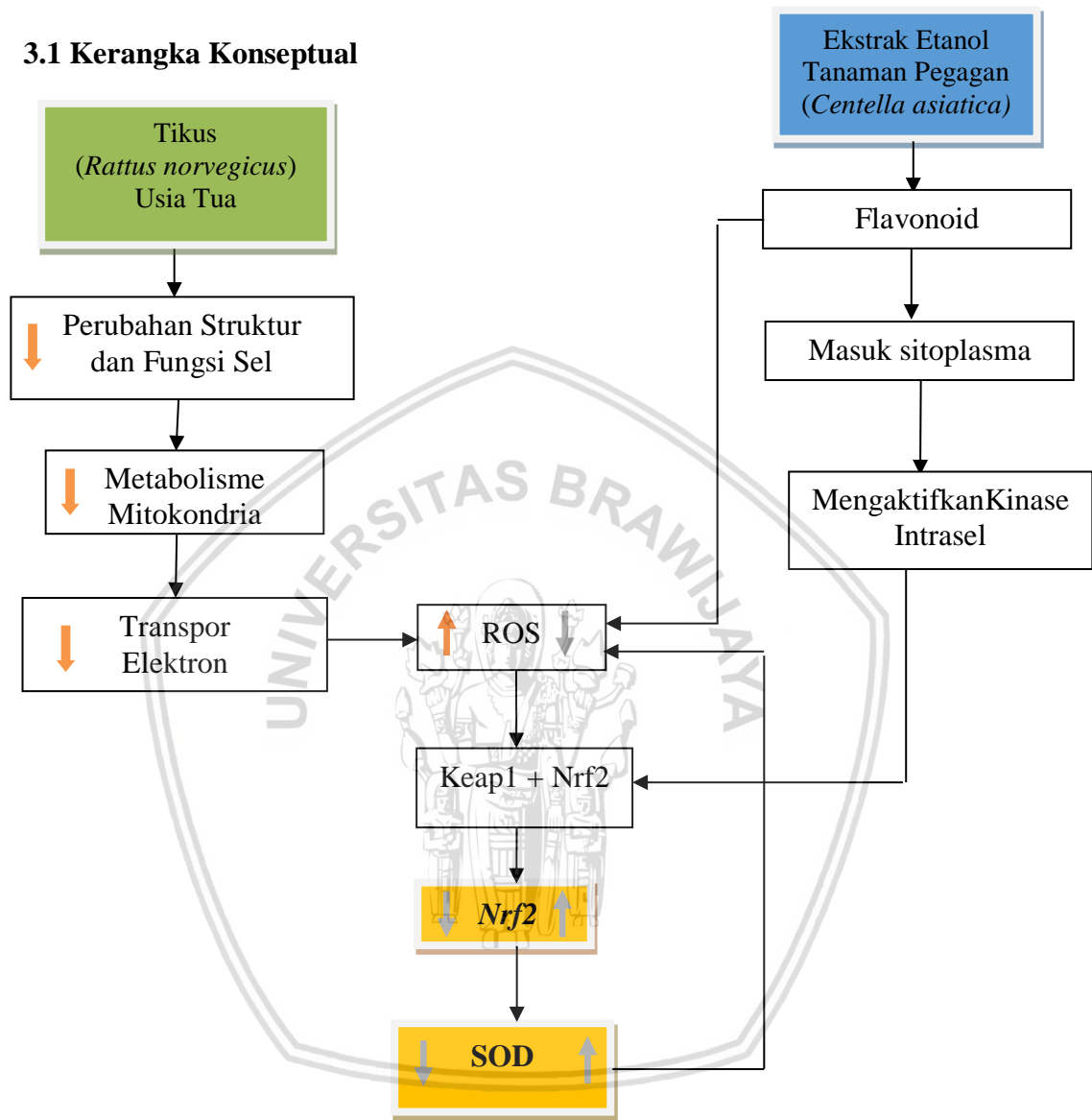
Menurut (Widayati, 2008) Ada beberapa faktor yang mempengaruhi spermatogenesis:

1. Peningkatan suhu di dalam testis akibat demam berkepanjangan atau akibat panas yang berlebihan bisa menyebabkan berkurangnya jumlah sperma, berkurangnya pergerakan sperma dan meningkatkan jumlah sperma yang abnormal di dalam semen.
2. Faktor lain yang mempengaruhi jumlah sperma adalah pemakaian marijuana atau obat-obatan (misalnya simetidin, spironolakton dan nitrofurantoin).

Varikokel merupakan kelainan anatomis yang paling sering ditemukan pada kemandulan jantan. Varikokel adalah varises (pelebaran vena) di dalam skrotum. Varikokel bisa menghalangi pengaliran darah dari testis dan mengurangi laju pembentukan sperma.

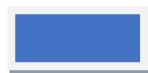
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1. Kerangka konsep penelitian.

Keterangan :



: Variabel bebas



: Variabel kendali



: Variabel bergantung



: Kondisi tikus tua



: Efek pemberian *Centella asiatica*

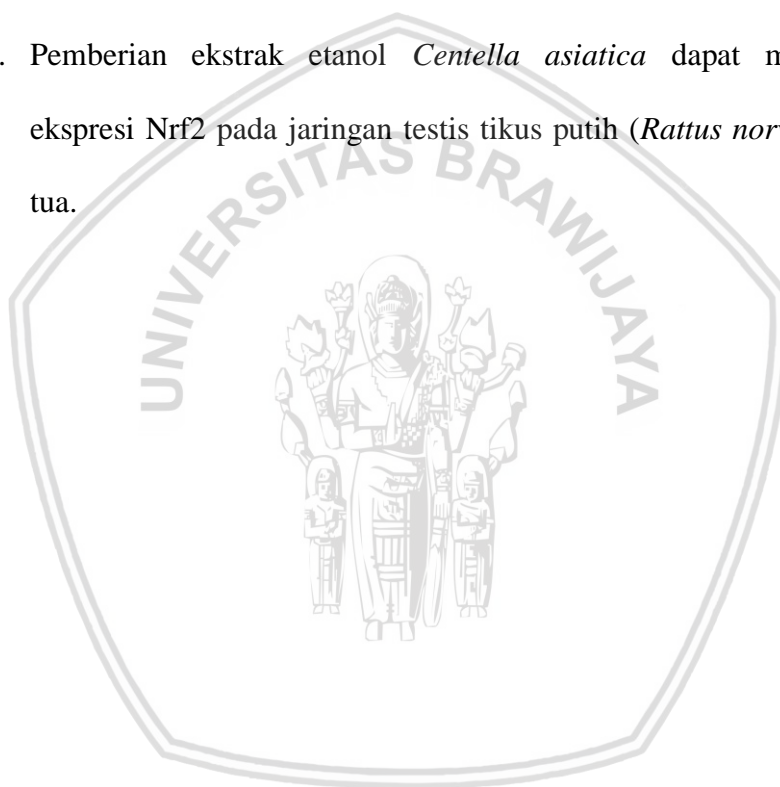
Tikus (*Rattus norvegicus*) yang digunakan merupakan galur SD usia tua yaitu sekitar 2 tahun. Proses penuaan secara fisiologis mengakibatkan tikus mengalami perubahan struktur dan penurunan fungsi sel. Kondisi tersebut mengakibatkan gangguan pada metabolisme mitokondria yaitu pada respirasi aerob dan mengakibatkan terganggunya dari proses transpor elektron yang dapat memicu akumulasi dari produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang akan meningkat.

Ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) diberikan pada tikus usia tua melalui sonde peroral. Tanaman pegagan memiliki kandungan flavonoid yang menginduksi Nrf2 yang nantinya akan mengaktifkan SOD. Kenaikan kadar SOD dan Nrf2 terjadi karena induksi senyawa isoflavon (golongan flavonoid) masuk ke dalam sitoplasma mengaktifkan kinase intrasel yang kemudian melakukan reaksi fosforilasi pada Nrf2. Sedangkan ROS yang akan memodifikasi residu sistein Keap-1 (Kelch ECH associating protein) menyebabkan pelepasan dan translokasi faktor transkripsi Nrf2 ke dalam inti sel. Sehingga diharapkan mempercepat reaksi dari Nrf2 terhadap ROS dan membuat ROS tidak akan mengalami kenaikan jumlah secara signifikan. Kemudian Nrf2 akan berikatan dengan ARE (*antioxidant response element*) dan sMAF pada daerah promoter dari gen target sehingga dapat menginduksi antioksidan enzimatis SOD. SOD akan bekerja untuk menurunkan kadar ROS. Diharapkan juga antioksidan flavonoid yang berasal dari tanaman pegagan juga mampu menurunkan produksi dari ROS secara langsung.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep yang telah diuraikan didapatkan hipotesa penelitian sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* dapat meningkatkan ekspresi SOD pada jaringan testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua.
2. Pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* dapat meningkatkan ekspresi Nrf2 pada jaringan testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua.



BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni 2017 hingga bulan Oktober 2017. Dengan uraian tempat pelaksanaan penelitian sebagai berikut :

- a. Proses ekstraksi *Centella asiatica* dilakukan di Materia Medika, Batu.
- b. Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorim Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- c. Pengoleksian sampel dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- d. Immunohistokimia untuk melihat ekspresi SOD dan NRF-2 dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang terdiri dari 4 kelompok perlakuan. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008) :

$$\begin{aligned}t(n-1) &\geq 15 \\4(n-1) &\geq 15 \\4n-4 &\geq 15 \\4n &\geq 19 \\n &\geq 5\end{aligned}$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok
n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan diatas maka untuk empat kelompok hewan coba diperlukan jumlah ulangan paling sedikit lima ekor dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental menggunakan model Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan membagi hewan coba menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol positif (KP), kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), dan kelompok perlakuan 3 (P3) (**Tabel 4.1**) :

Tabel 4.1. Kelompok Perlakuan pada Penelitian

Kelompok	Keterangan
Kontrol Positif	Kontrol tikus tua yang hanya diberikan pakan dan minum <i>ad libitum</i> selama 21 hari tanpa diberikan ekstrak <i>Centella asiatica</i>
Perlakuan 1	Tikus tua diberikan ekstrak <i>Centella asiatica</i> dengan volume pemberian 1 mL selama 21 hari dengan dosis 100mg/kg BB
Perlakuan 2	Tikus tua diberikan ekstrak <i>Centella asiatica</i> dengan volume pemberian 1 mL selama 21 hari dengan dosis 200mg/kg BB
Perlakuan 3	Tikus tua diberikan ekstrak <i>Centella asiatica</i> dengan volume pemberian 1 mL selama 21 hari dengan dosis 300mg/kg BB

4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati pada penelitian ini yaitu :

Variabel bebas : Ekstrak *Centella asiatica*

Variabel tergantung : Ekspresi SOD dan NRF-2

Variabel kendali : Homogenitas tikus SD (jantan, berat badan dan umur),

homogenitas pakan (komposisi ransum pakan disusun

berdasarkan standar AOAC yaitu mengandung karbohidrat, protein, lemak, mineral, vitamin, dan air), homogenitas kandang (ukuran, suhu, dan kandang).

4.5 Materi Penelitian

4.5.1 Alat

Alat yang dipakai dalam penelitian ini yaitu kandang pemeliharaan hewan coba, tempat makan dan minum tikus, box paparan, sonde, seperangkat alat bedah, cawan petri, gelas objek, pot sampel, refrigerator, tabung reaksi, sentrifugator, pipet tetes, gelas ukur, *maserator*, *rotary evaporator*, *vacum drying*, TEM, mikrotom, cover glass, dan mikroskop cahaya.

4.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang dipakai dalam penelitian ini adalah *Centella asiatica*, alkohol, NaCl fisiologis, aquades, serbuk simplisia, etanol 70%, letichin, ekstrak pegagan, aqua bebas CO₂, PFA 4%, alkohol (70%, 80%, 90%, 95%), xylol, PBS, dan Anti SOD dan Anti NRF-2

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Preparasi Hewan Coba

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan strain SD (*Sprague dawley*) umur 2 tahun berjenis kelamin jantan hasil perkembangbiakan yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran UB dengan bobot badan awal berkisar 300 gram. Kandang yang digunakan berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm. Ransum yang diberikan

sebanyak 20 g per ekor per hari. Air minum diberikan secara *ad libitum*. Suhu ruangan diatur pada 22-24°C dengan kelembapan udara 60%-70%. Setiap 3 hari dilakukan penimbangan bobot badan per tikus dan pembersihan kandang. Aklimatisasi tikus terhadap lingkungan selama 7 hari dilakukan pada awal penelitian dengan pemberian ransum serta bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang menggunakan bahan mudah dibersihkan dan disanitasi (Pratama dkk., 2013).

4.6.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Cetella asiatica*)

Phytosome ekstrak tanaman pegagan pada penelitian ini dibuat dengan cara membentuk ekstrak terlebih dahulu. Sebanyak 500g serbuk simplisia ditambahkan 2 L etanol 70%, dicampur dalam maserator dengan pengadukan pelan selama 30 menit pada awal perendaman. Campuran disimpan selama 24 jam dengan sering dilakukan remaserasi. Filtrat disaring dan diuapkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu sebesar 30°C dan dilakukan *vacum drying* untuk menghilangkan kadar air (Zulkarnaen dkk., 2016).

Ekstrak tanaman pegagan kemudian dibuat bentuk *phytosome* dengan metode sonikasi (mencampur letichin, etanol 70%, ekstrak tanaman pegagan) lalu distirer selama 3 jam dengan *magnetig striter* 2000rpm. Dilakukan penguapan pelarut dengan *rotary evaporator* kemudian dihidrasi dengan aqua bebas CO₂. Lalu dilakukan karakterisasi menggunakan TEM (Zulkarnaen dkk., 2016).

4.6.3 Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Cetella asiatica*) pada Hewan Coba

Pemberian ekstrak etanol dilakukan dengan dosis bertingkat menurut Kashmira dkk., (2010), 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB, dan 300 mg/kg BB pada masing-masing kelompok perlakuan. Pemberian ekstrak etanol dilakukan secara per oral menggunakan teknik sonde lambung selama 21 hari sebanyak 1 mL per tikus perhari.

4.6.4 Pengambilan Sampel Organ Testis

Pengambilan organ testis dilakukan pada kelompok kontrol positif, kontrol negatif, perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3 dilakukan pada hari ke 22 setelah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan. Pada akhir penelitian dilakukan euthanasi dengan cara dislokasio *Os Occipitale* kemudian tikus diletakkan dalam posisi rebah dorsal pada papan pembedahan. Kemudian pembedahan dilakukan dengan membuka muskulus sepanjang abdomen sampai bawah mandibula. Selanjutnya testis diambil dari skrotum di daerah prepubis dilanjutkan dengan memotong organ testis kemudian diisolasi. Organ testis lalu dibilas dengan NaCl fisiologis pada cawan petri dan direndam dalam pot organ.

4.6.5 Pembuatan Preparat Histologi Jaringan Testis

Setelah hewan dinekropsi kemudian organ testis diambil lalu dicuci dengan 0,9% NaCl fisiologis, dimasukkan ke dalam larutan formaldehide 4% selama 24 jam. Setelah testis terfiksasi, larutan diganti dengan alkohol 70% yang dikenal sebagai “*stopping point*” yang berfungsi untuk mengawetkan jaringan. Dehidrasi dari jaringan dilakukan menggunakan alkohol dengan

konsentrasi bertingkat mulai 80% sampai dengan 100% dan dijernihkan dengan xylol (*clearing*) sebelum akhirnya dilakukan *embedding* yaitu ditanam dalam blok parafin. Jaringan dalam blok parafin kemudian disayat secara serial menggunakan *mikrotom rotary* dengan ketebalan 5 μ m dan dilekatkan pada *object glass* yang telah dilapisi dengan alkohol 70%, kemudian disimpan dalam inkubator dengan suhu 40°C selama 24 jam.

4.6.6 Analisis Ekspresi SOD pada jaringan testis dengan Metode IHK

Pewarnaan imunohistokimia memiliki 3 tahapan yang dilakukan, yaitu preparasi gelas obyek yang digunakan untuk penempelan preparat atau sediaan histologis, pembuatan neufren (agen penempel) untuk membantu proses *afixing* preparat ke gelas obyek dan prosedur pewarnaan imunohistokimia. Pewarnaan imunohistokimia meliputi beberapa tahap preparasi, antara lain preparasi gelas obyek, pelapisan (*coating*) gelas obyek dengan neufren, penempelan preparat irisan pada gelas obyek dan prosedur pewarnaan imunohistokimia (Samson dan Unitily, 2014).

Proses pertama yang dilakukan adalah deparafinasi (xylol I dan II) merupakan proses penghilangan parafin dalam jaringan. Caranya preparat dimasukkan ke dalam xylol bertingkat I sampai II masing-masing selama lima menit. Proses ini dimaksudkan untuk mempermudah proses masuknya zat warna ke dalam jaringan. Merupakan suatu proses menghilangkan parafin yang terdapat di dalam jaringan.

Setelah itu dilakukan rehidrasi (alkohol absolut III, II, I – 95%, 90%, 85%, 80%, 70%), DW/milique (MQ) selama 10-15 menit. Kemudian

penghilangan peroksidase endogen dengan membloking ezim-enzim endogen agar hasil yang keluar dengan interpretasi yang benar. Bloking enzim dilakukan dengan memberikan hidrogen peroksidase (H_2O_2) sebagai substrat peroksidase pada *glass slide*.

Setelah itu dilakukan pencucian dengan menggunakan mikropipet: (a) DW/MQ sebanyak 100 μ l selama 5-10 menit sebanyak 2x dilanjutkan pencucian dengan menggunakan (b) PBS (*phospat buffer saline*) sebanyak 100 μ l selama 5-10 menit sebanyak 2x. Permukaan sediaan di sekitar jaringan dikeringkan menggunakan kertas tisu. Sediaan selanjutnya disejajarkan secara mendatar dalam PBS sehingga terjadi bloking antigen/Ag non spesifik dan tidak mengacaukan reaksi, kotak kemudian ditutup rapat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30-60 menit. Dicuci dengan PBS (100 μ l) selama 5 menit sebanyak 3x.

Proses selanjutnya yaitu dikeringkan kembali sisa-sisa PBS yang masih menempel dan disiapkan antibodi primer menggunakan antibodi anti Nrf2 (*Santa cruz*). Diberi antibodi/Ab primer anti Nrf2 diinkubasi dalam refigator suhu 4°C selama 1 malam. Penggunaan Ab primer tersebut disesuaikan dengan senyawa atau bahan bioaktif yang akan dideteksi. Dicuci lagi menggunakan PBS (100 μ l) selama 10 menit sebanyak 3x.

Setelah itu diberi antibodi/Ab sekunder yaitu antibodi sekunder menggunakan ScyTek CRF *Anti-polyvalent HRP Polymer-ABZ100* dengan pengenceran 1:50 ml sebanyak 50-60 atau 80 μ l per preparat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30-60 menit. Dicuci dengan PBS (100 μ l) selama 5

menit (3x). Visualisasi dilakukan dengan menggunakan: DAB (3,3-diaminobenzidine) sebanyak 10 mg dalam *tris buffer* (50 cc) yang dicampur dengan H_2O_2 (50 μ l). Proses pencampuran dilakukan sesaat sebelum preparat dimasukkan dan kemudian ditutup selama 25 menit. Bahan bioaktif yang terdeteksi akan terwarnai coklat. selanjutnya Dicuci atau dimasukkan dalam DW/MQ (*stopping point*) selama 10-15 menit.

Proses terakhir yaitu dilakukan dehidrasi (70%, 80%, 85%, 90%, dan 95%) bagian bawah gelas obyek dilap tisu (untuk menghindari terjadinya pengenceran), dilanjutkan ke alkohol absolut I, II, III, bagian bawah gelas obyek dilap dengan tisu lagi, *clearing* (xylol I, II, III) dan *mounting*. Pembacaan ekspresi SOD dianalisa dengan metode Imunohistokimia (IHK).

4.6.7 Analisis Ekspresi Nrf2 pada jaringan testis dengan Metode IHK

Proses pertama yang dilakukan adalah deparafinasi (xylol I dan II) merupakan proses penghilangan parafin dalam jaringan. Caranya preparat dimasukkan ke dalam xylol bertingkat I sampai II masing-masing selama lima menit. Proses ini dimaksudkan untuk mempermudah proses masuknya zat warna ke dalam jaringan. Merupakan suatu proses menghilangkan parafin yang terdapat di dalam jaringan.

Setelah itu dilakukan rehidrasi (alkohol absolut III, II, I – 95%, 90%, 85%, 80%, 70%), DW/milique (MQ) selama 10-15 menit. Kemudian penghilangan peroksidase endogen dengan membloking ezim-enzim endogen agar hasil yang keluar dengan interpretasi yang benar. Bloking enzim

dilakukan dengan memberikan hidrogen peroksidase (H_2O_2) sebagai substrat peroksidase pada *glass slide*.

Setelah itu dicuci menggunakan mikropipet: (a) DW/MQ sebanyak 100 μ l selama 5-10 menit sebanyak 2x dilanjutkan pencucian dengan menggunakan PBS (*phospat buffer saline*) sebanyak 100 μ l selama 5-10 menit 2x. Permukaan sediaan di sekitar jaringan dikeringkan menggunakan kertas tisu dengan tetap menjaga jaringan untuk tidak kering. Sediaan selanjutnya disejajarkan secara mendatar dalam PBS sehingga terjadi bloking antigen/Ag non spesifik dan tidak mengacaukan reaksi, kotak kemudian ditutup rapat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30-60 menit. Dicuci dengan PBS (100 μ l) selama 5 menit sebanyak 3x.

Proses selanjutnya yaitu dikeringkan kembali sisa-sisa PBS yang masih menempel dan disiapkan antibodi primer menggunakan antibodi anti Nrf2

(*Santa cruz*). Diberi antibodi/Ab primer anti Nrf2 diinkubasi dalam refigator suhu 4°C selama 1 malam. Penggunaan Ab primer tersebut disesuaikan dengan senyawa atau bahan bioaktif yang akan dideteksi. Dicuci lagi menggunakan PBS (100 μ l) selama 10 menit sebanyak 3x.

Setelah itu diberi antibodi/Ab sekunder yaitu antibodi sekunder menggunakan ScyTek CRF *Anti-polyvalent HRP Polymer-ABZ100* dengan pengenceran 1:50 ml sebanyak 50-60 atau 80 μ l per preparat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30-60 menit. Dicuci dengan PBS (100 μ l) selama 5 menit (3x). Visualisasi dilakukan dengan menggunakan: DAB (3,3-*diaminobenzidine*) sebanyak 10 mg dalam *tris buffer* (50 cc) yang dicampur

dengan H_2O_2 (50 μl). Proses pencampuran dilakukan sesaat sebelum preparat dimasukkan dan kemudian ditutup (gelap) selama 25 menit. Bahan bioaktif yang terdeteksi akan terwarnai coklat. Dicuci atau dimasukkan dalam (*stopping point*) selama 10-15 menit.

Proses terakhir yaitu dilakukan dehidrasi (70%, 80%, 85%, 90%, dan 95%) bagian bawah gelas obyek dilap tisu (untuk menghindari terjadinya pengenceran), dilanjutkan ke alkohol absolut I, II, III, bagian bawah gelas obyek dilap dengan tisu lagi, *clearing* (xylol I, II, III) dan *mounting*. Pembacaan ekspresi Nrf2 dianalisa dengan metode Imunohistokimia (IHK).

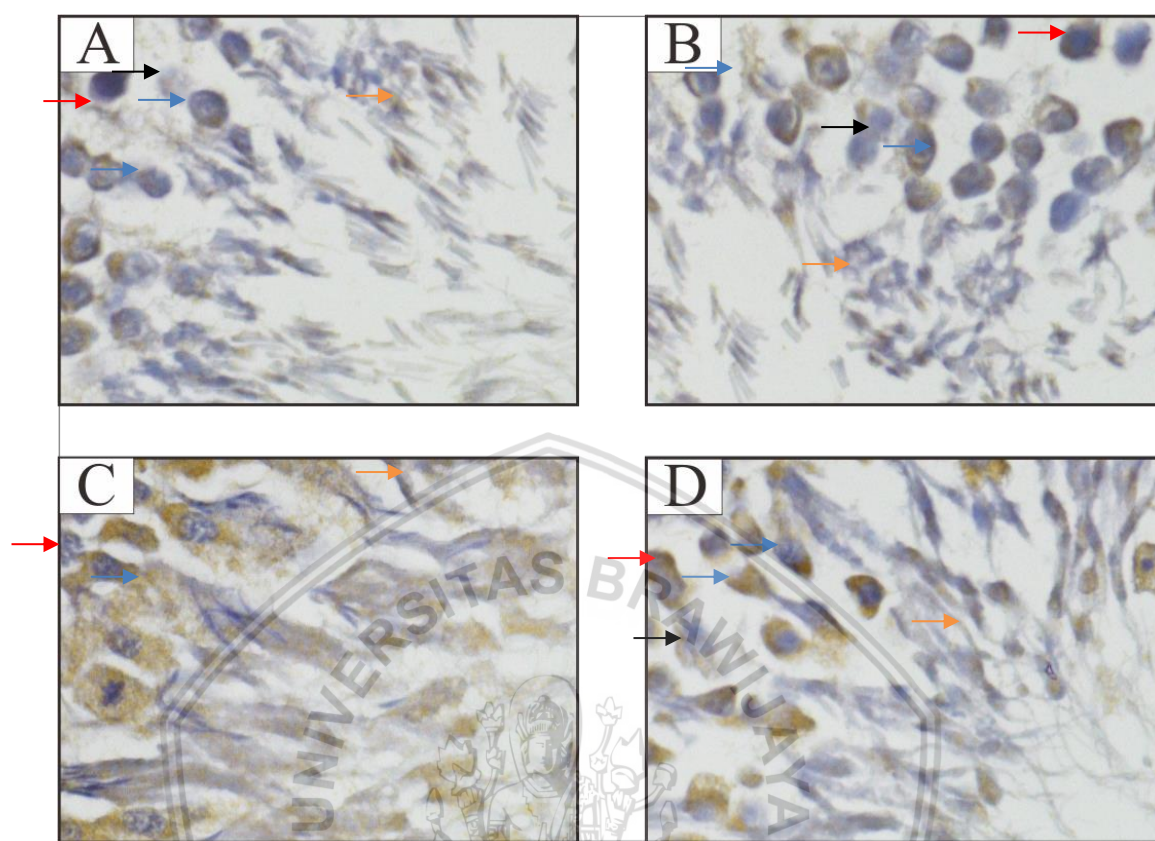
4.6.8 Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini berupa data kuantitatif untuk mengetahui ekspresi SOD dan NRF2 melalui penghitungan jumlah sel yang terekspresi menggunakan mikroskop dengan 20x lapang pandang dan perbesaran 1000x yang kemudian dianalisis dengan ANOVA. Jika ada perbedaan maka akan diuji menggunakan uji Tukey menggunakan *software SPSS for windows version 16.0* dengan $\alpha = 0,05$ untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi *Nuclear Factor Erythroid related Factor-2* (Nrf2)

Ekspresi Nrf2 ditandai dengan adanya area ekspresi warna coklat pada jaringan akibat ikatan antigen dan antibodi pada jaringan yaitu antibodi primer dan antibodi sekunder. Ekspresi Nrf2 jaringan testis pada hewan coba kontrol positif dapat dilihat dengan area berwarna coklat pada tubulus seminiferus (**Gambar 5.1**). Ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) pada dosis pemberian 100 mg/KgBB, dosis 200mg/KgBB, dan 300 mg/KgBB terjadi peningkatan ekspresi area yang terwarnai coklat pada tubulus seminiferus jika dibandingkan dengan kontrol positif (**Gambar 5.1**). Peningkatan tertinggi terjadi pada dosis 200 mg/KgBB dibandingkan perlakuan yang lain. Terlihat bahwa pada tubulus seminiferus sel yang terwarnai coklat lebih terlihat dibandingkan dengan dua perlakuan lain yaitu mulai dari spermatogonium hingga spermatid serta sel sertoli. Hal tersebut terjadi dikarenakan ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mampu mempercepat reaksi untuk meningkatkan ekspresi Nrf2 yang nantinya mampu mengaktifkan enzim antioksidan endogen (Mingzhan dkk., 2008).



Gambar 5.1. Gambaran ekspresi Nrf2 Jaringan Testis dengan Metode Immunohistokimia perbesaran 1000x

A = Kontrol positif (tikus tua)

B = Perlakuan 1 (pemberian ekstrak etanol pegagan 100mg/kgBB)

C = Perlakuan 2 (pemberian ekstrak etanol pegagan 200mg/kgBB)

D = Perlakuan 3 (pemberian ekstrak etanol pegagan 300mg/kgBB)

Keterangan:

→ : Spermatogonium

→ : Spermatosit

→ : Sertoli

→ : Spermatid

Kelompok kontrol positif memiliki rata-rata ekspresi sebesar $190 \pm 12,34$. Didapatkan nilai rata-rata ekspresi Nrf2 pada 3 perlakuan lebih tinggi jika dibanding dengan KP (kontrol positif). Kelompok perlakuan 1 dosis 100mg/KgBB menunjukkan ekspresi Nrf2 dengan nilai rata-rata sebesar $283,2 \pm 11,77$ (**Tabel 5.1**). Rataan tersebut menunjukkan peningkatan sebanyak 48% jika dibandingkan kontrol positif. Kelompok perlakuan 2 dosis 200 mg/KgBB

memiliki nilai rata-rata ekspresi Nrf2 yang berbeda signifikan dari kontrol positif dan kelompok perlakuan 1. Hasil pada kelompok perlakuan 2 menunjukkan rata-rata sebesar $387 \pm 9,16$ (**Tabel 5.1**). Terjadi peningkatan sebanyak 100% pada kelompok perlakuan 2 jika dibandingkan dengan kontrol positif. Sedangkan pada kelompok perlakuan 3 dosis 300 mg/KgBB menunjukkan nilai rata-rata ekspresi Nrf2 sebesar $301,2 \pm 11,58$ yang menunjukkan peningkatan sebesar 58% dibandingkan dengan kontrol positif. Tetapi pada dosis pemberian 3 ekspresi Nrf2 tidak berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 (**Tabel 5.1**). Peningkatan pada ketiga perlakuan tersebut menunjukkan bahwa seluruh perlakuan yang diberikan ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mengalami peningkatan ekspresi Nrf2. Peningkatan tertinggi terjadi pada kelompok perlakuan 2 yang dosis 200 mg/Kg BB.

Tabel 5.1 Hasil Uji Tukey Terhadap Ekspresi Nrf2

Kelompok	Rata-rata Ekspresi Nrf2 \pm SD (sel)
KP	$190 \pm 12,34^a$
Dosis 1 (100 mg/kg BB)	$283,2 \pm 11,77^b$
Dosis 2 (200 mg/kg BB)	$387 \pm 9,16^c$
Dosis 3 (300 mg/kg BB)	$301,2 \pm 11,58^b$

Keterangan: Notasi a, b, dan c menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara satu perlakuan dengan perlakuan lainnya.

Peningkatan ekspresi Nrf2 pada setiap perlakuan terjadi karena pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan. Ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella*

asiatica) mengandung flavonoid mampu berikatan dengan estrogen reseptor di permukaan sel kemudian melalui reaksi cascade mengaktifkan protein kinase yang kemudian akan melakukan reaksi fosforilasi oksidatif pada Nrf2 yang berikatan dengan protein Keap1 (Li dkk., 2008). ROS juga akan memodifikasi residu sistein dari Keap1. Kondisi tersebut menyebabkan ikatan Nrf2 dan Keap1 terlepas. Selanjutnya Nrf2 akan menuju ke inti sel dan berikatan dengan ARE (*Antioxydant Response Element*) reseptor di gen bersama protein MAF. Ikatan tersebut akan menyebabkan produksi enzim antioksidan seperti SOD (Mingzhan dkk., 2008).

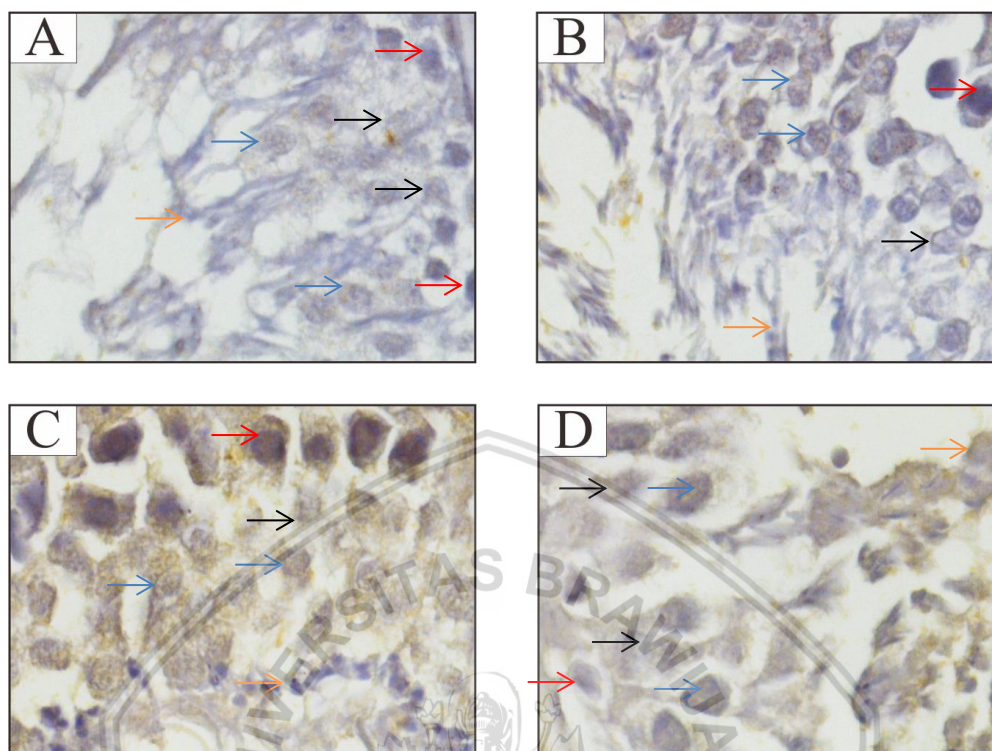
Nrf2 (*nuclear factor-erythroid-2 related factor 2*) merupakan faktor transkripsi yang akan mengatur aktivasi enzim antioksidan endogen dalam tubuh yang diproduksi pada sitoplasma. Menurut Kamalia (2016) pada kondisi fisiologis stres oksidatif akan memicu *up regulation* dari antioksidan endogen dan protein sitoprotektif untuk mencegah atau membatasi kerusakan jaringan. Mekanisme kerja dari Nrf2 yaitu dengan membentuk berbagai macam enzim antioksidan seperti Glutathione peroksidase, Heme-oksigenase, SOD dan sebagainya (Mingzhan dkk., 2008). Pada keadaan normal Nrf2 akan terikat pada protein Keap1 untuk dilakukan degradasi. Kondisi penuaan yang menyebabkan terganggunya metabolisme dalam mitokondria menyebabkan meningkatnya jumlah ROS dalam tubuh dan dapat mengakibatkan kerusakan sel. Pemberian ekstrak tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dengan dosis 200 mg/KgBB dapat meningkatkan ekspresi enzim antioksidan Nrf2 tertinggi.

Pada kelompok perlakuan 3 yaitu pada dosis 300 mg/KgBB pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan terjadi peningkatan ekspresi Nrf2 jika

dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Tetapi pada dosis tersebut terjadi penurunan nilai rata-rata ekspresi jika dibandingkan pada kelompok perlakuan 2 dosis pemberian 200 mg/Kg BB. Ekspresi pada dosis tersebut tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 dengan dosis 100mg/KgBB. Penurunan ekspresi tersebut terjadi diduga karena sistem homeostasis Nrf2 setelah mencapai dosis maksimum pada dosis 200 mg/KgBB (Chen dkk., 2014). Menurut (Mingzhan dkk., 2008), Nrf2 yang terikat pada promotor gen selain akan menghasilkan enzim antioksidan juga menghasilkan Nrf2 dan Keap1, sehingga jumlah Nrf2 dirasa cukup untuk menghasilkan enzim antioksidan dan selanjutnya ikatan antara Keap1 dan Nrf2 tetap dipertahankan dan tidak dilakukan pelepasan Nrf2 menuju inti sel.

1.2 Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi *Superoxyde Dismutase* (SOD)

Potensi ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi SOD (*Superoxyde Dismutase*) pada jaringan testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua dilakukan pengamatan dengan menggunakan metode immunohistokimia (IHK). Ekspresi SOD pada jaringan testis tikus tua terlihat dengan ekspresi berwarna coklat yang terdapat pada masing-masing sitoplasma sel pada tubulus seminiferus. Sel yang terekspresi yaitu mulai dari sel spermatogonium, spermatosit, spermatid, dan sel sertoli.



Gambar 5.2. Gambaran ekspresi SOD Jaringan Testis dengan Metode Immunohistokimia perbesaran 1000x

A = Kontrol positif (tikus tua)

B = Perlakuan 1 (pemberian ekstrak etanol pegagan 100mg/kgBB)

C = Perlakuan 2 (pemberian ekstrak etanol pegagan 200mg/kgBB)

D = Perlakuan 3 (pemberian ekstrak etanol pegagan 300mg/kgBB)

Keterangan:

→ (red)	: Spermatogonium	→ (blue)	: Spermatosit
→ (black)	: Sertoli	→ (orange)	: Spermatid

Ekspresi SOD pada jaringan testis tikus tua hewan coba kontrol positif terekspresi pada tubulus seminiferus (**Gambar 5.2A**). Pada kelompok perlakuan 1 yaitu dengan pemberian dosis 100mg/KgBB terlihat beberapa sel seperti spermatogonium, sel sertoli, dan spermatid berwarna coklat yang terekspresi pada tubulus seminiferus menunjukkan peningkatan ekspresi SOD dibandingkan dengan kontrol positif (**Gambar 5.2.B**). Kelompok perlakuan 2 dengan dosis pemberian 200 mg/KgBB mengalami peningkatan dibandingkan kontrol positif

dan kelompok perlakuan 1 yang terlihat pada tubulus seminiferus jaringan testis mulai dari sel spermatogonium, sel sertoli, spermatid, dan spermatozoa (**Gambar 5.2.C**). Dosis pemberian 300 mg/KgBB dalam perlakuan 3 mengalami peningkatan ekspresi sel dibandingkan dengan kontrol positif. Sel yang terekspresikan pada kelompok perlakuan 3 lebih sedikit dibandingkan perlakuan 2 namun lebih banyak jika dibandingkan dengan perlakuan 1 (**Gambar 5.2.D**). Kelompok perlakuan 2 dengan dosis pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan mengalami peningkatan ekspresi SOD tertinggi dibandingkan kelompok perlakuan lain.

Tabel 5.2 Hasil Uji Tukey Terhadap Ekspresi SOD

Kelompok	Rata-rata Ekspresi SOD ± SD (sel)
KP	118 ± 10,87 ^a
Dosis 1 (100 mg/kg BB)	170,2 ± 13,79 ^b
Dosis 2 (200 mg/kg BB)	353,2 ± 34,82 ^c
Dosis 3 (300 mg/kg BB)	186,8 ± 3,32 ^b

Keterangan: Notasi a, b, dan c menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara satu perlakuan dengan perlakuan lainnya.

Pada semua kelompok perlakuan ekstrak etanol tanaman pegagan memiliki perbedaan yang nyata dengan ekspresi SOD pada KP (kontrol positif) sebesar 118 ± 10,87 sel (**Tabel 5.2**). Kelompok perlakuan 1 dengan dosis ekstrak etanol tanaman pegagan memiliki nilai sebesar 100 mg/kg BB memiliki nilai rata-rata ekspresi SOD sebesar 170,2 ± 13,79 sel. Rataan tersebut menunjukkan peningkatan 45% dibandingkan dengan kontrol positif. Kelompok perlakuan 2

memiliki nilai rata-rata sebesar $353,2 \pm 34,82$ sel dan menunjukkan peningkatan sebanyak 195% dibandingkan kontrol positif. Rataan pada kelompok perlakuan 2 berbeda signifikan dibandingkan dengan kontrol positif dan kelompok perlakuan 1 (**Tabel 5.2**). Pada kelompok perlakuan 3 terjadi peningkatan sebanyak 50% dibandingkan kontrol positif. Kelompok perlakuan 3 dosis 300 mg/KgBB memiliki nilai rata-rata ekspresi SOD sebesar $186,8 \pm 3,32$ sel. Nilai rata-rata ekspresi pada kelompok perlakuan 3 lebih rendah dibandingkan perlakuan 2 tetapi lebih besar jika dibandingkan dengan perlakuan 1. Pada kelompok perlakuan 3 kenaikan yang terjadi tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1. Peningkatan ekspresi tertinggi terjadi pada kelompok perlakuan 2 dengan dosis pemberian 200mg/KgBB. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak tanaman pegagan yang diberikan pada perlakuan 1,2, dan 3 dapat meningkatkan reaksi Nrf2 sebagai faktor transkripsi gen sehingga dapat menghasilkan peningkatan ekspresi SOD tubulus seminiferus tikus tua. Peningkatan tersebut sesuai dengan pendapat Kormin (2005), karena ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mengandung berbagai senyawa kimia yaitu minyak esensial, triterpenoid dan flavonoid yang berguna sebagai antioksidan untuk menangkal radikal bebas.

Peningkatan ekspresi pada kelompok perlakuan 1 dan 2 terjadi karena ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mengandung flavonoid mampu menembus membran sel kemudian masuk pada sitoplasma mengaktifkan gen transkripsi untuk selanjutnya memproduksi enzim-enzim antioksidan yaitu SOD. Enzim SOD yang dihasilkan nantinya akan beraksi untuk menangkal ROS

pada sel jaringan testis tikus yang terakumulasi akibat menurunnya metabolisme mitokondria sehingga dapat mencegah terjadinya kerusakan sel setelah terjadinya stres oksidatif (Li dkk., 2008).

Pada kelompok perlakuan 3 yaitu pada dosis 300 mg/KgBB pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan terjadi peningkatan ekspresi SOD jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Ekspresi tersebut tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 dengan dosis 100mg/KgBB. Tetapi pada dosis tersebut terjadi penurunan ekspresi SOD jika dibandingkan pada kelompok perlakuan 2 dosis pemberian 200 mg/Kg BB (**Tabel 5.2**). Penurunan ekspresi tersebut terjadi diduga karena sistem homeostasis Nrf2 setelah mencapai dosis maksimum pada dosis 200 mg/KgBB. Penurunan ekspresi tersebut dikarenakan jumlah antioksidan SOD yang dihasilkan sudah mampu menangkal dari radikal bebas sehingga ikatan Keap1 dan Nrf2 tidak dapat memodifikasi residu sistein Keap1, sehingga Nrf2 tidak dilepaskan untuk masuk inti sel menghasilkan enzim antioksidan (Mingzhan dkk., 2008).

Menurut (Li dkk., 2008), SOD merupakan garis pertahanan terdepan spermatozoa terhadap aktivasi dan toksisitas senyawa ROS. Menurut Sikka (2004), SOD dilaporkan dapat menekan peroksidasi lipid, proses oksidasi, kerusakan sel spermatozoa, dan meningkatkan status antioksidan. Enzim SOD intrasel bekerja dengan cara membersihkan radikal bebas atau ROS dengan reaksi enzimatik dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil dibantu dengan enzim glutathion peroksidase yang akan mengubah H_2O_2 menjadi H_2O .

BAB VI PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan didapatkan hasil kesimpulan sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) meningkatkan ekspresi SOD pada jaringan testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua dengan dosis pemberian optimum yaitu 200 mg/kg BB.
2. Pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mempercepat reaksi ekspresi Nrf2 pada jaringan testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua dengan dosis pemberian optimum yaitu 200 mg/kg BB.

6.2 Saran

Perlu adanya studi lanjutan mengenai pengaruh peningkatan jumlah Nrf2 dan SOD dalam menanggulangi radikal bebas dengan performa seksual dari hewan berusia tua.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdi Redha. 2010. *Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif Dan Peranannya Dalam Sistem Biologis*. Jurnal Vol.9 No. 2 Sep. 2010: 196-202. Pontianak: Politeknik Negeri Pontianak
- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi Sebagai Anti Fertilitas*. Jakarta : Adabia Press. 4-5
- Anateria, R. A. 2009. *Aktivitas Spesifik Katalase Jaringan Ginjal Tikus yang Diinduksi Hipoksia Hipobarik Akut Berulang*. Skripsi. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia: Jakarta
- Andreollo N., A. Santos E., F. Araujo M., R. Lopes L., R. 2012. *Rat's Age Versus Human's Age: What is The Relationship?*. Brazil: Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas
- Bane, A., and Nicander, L. (1966). *Electron and light microscopial studies on Spermatoliosis in a boar with Acrosome Abnormalities*. J. Reprod, Fertility 11, 133
- Chen J. Zhang Z. Cai L. 2014. *Diabetic Cardiopathy and Its Prevention by Nrf2: Current Status*. Diabetes and Metabolism Journal. Kosair Children's Hospital Research Institute, Department of Pediatrics, the University of Louisville School of Medicine, Louisville, KY, USA, The Center of Cardiovascular Diseases, the First Hospital of Jilin University, Changchun, China
- Cunningham, W. 2003. Aging and Photo-aging. In: Baran R, Maibach HI, (eds). *Textbook of Cosmetic Dermatology*, 2nd edition. London: Martin dunitz, pp. 455-67
- Depkes RI. 1977. *Materia Medika Indonesia*. Jilid I. Jakarta
- Faranita, O. V. 2009. *Kualitas Spermatozoa pada Tikus Wistar Jantan Diabetes Melitus [Skripsi]*. Semarang : Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Ganong, W. F. (2008). *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran* Edisi 22. Jakarta: EGC.
- Gupta, Y.K. and M. H. V. Kumar. 2006. *Effect of Centella asiatica L. On pentylenetetrazole-induced kindling, Cognition and Oxidative Stress in Rats*. Journal Pharmacology Biochemistry and Behavior. (3): 579-585

- Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants: Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141:312-322
- Haris, M. 2011. Penentuan Kadar Flavanoid Total Dan Aktivitas Antioksidan Dari Daun Dewa (*Gynura pseudochina* [Lour] DC) Dengan spektrofotometer UV-Visibel. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Andalas. Padang.
- Hayati, A. 2010. *Spermatologi*. Surabaya : Airlangga University Press.
- Inglis JK. 1980. *Introduction to Laboratory Animal Science and Technology*. Oxford: Pengamon Press
- Junqueira L.C., J.Carneiro, R.O. Kelley. 2007. *Histologi Dasar*. Edisi ke-5. Tambayang J., penerjemah. Terjemahan dari Basic Histology. EGC. Jakarta.
- Kamalia, L. 2016. Peran Nrf2 Dalam Patogenesis Stres Oksidatif dan Inflamasi pada Penyakit Ginjal Kronik. Syifa' MEDIKA, Vol. 7 (No.1). Palembang: Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Palembang
- Kormin, S. 2005. The effect of Heat Processing on Triterpene Glycosides and Antioxidant Activity of Herbal Pegagan (*Centella asiatica*) Drink [Thesis]. Kuala Lumpur : Universiti Teknologi Malaysia.
- Kashmira J. Gohill, Jagruti A. Patel, Anuradha K. Gajjar. *Pharmacological Review on Centella asiatica: A Potential Herbal Cure-all*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2010 Sep-Oct; 72(5): 546-556
- Kusriningrum, 2008. *Perancangan Percobaan*. Airlangga University Press. Surabaya. 3-15.
- Krinke, G. J. 2000. *The Laboratory Rat*. San Diego, CA: Academic Press. Hal: 150-152
- Kusumawati. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Lasmadiwati, E.M.M Herminati, dan Y.H. Indriani. 2004. Pegagan Meningkatkan Daya Idat, Membuat Awet Muda, Menurunkan Gejala Stres dan Meningkatkan Stamina. Seri Agrisehat. Penerbit Penebar Swadaya, Jakarta. II + 69 hlm.
- Leeson, Roland et.al. 1998. *Buku Ajar Histologi edisi 5*. Jakarta : EGC.

- Li W, Khor TO, Xu C, Shen G, Jeong WS, Yu S, Kong A. 2008. Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuate NF-kB inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 76(11): 1485-1489
- Lusiana, F. Dhafir, dan Masrianih. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Motilitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) Galur DDY. *Journal E-Jipbiol.* Vol. 2: 24-29, Desember 2013.
- Malole MBM, CS Pramono. 1989. Penggunaan Hewan-hewan Percobaan Laboratorium. Bogor: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor.
- Mates JM, Gomez CP, Castro. 1999. Antioxidant Enzymes and Human Disease. *Clin Biochem.* 32 (8):595-603
- Meetha R.P. 2007. Perkembangan dan Pertumbuhan Ambing Tikus (*Rattus norvegicus*) pada Usia Kebuntingan 13,17, dan 21 Hari Akibat Penyuntikan bST (*bovine Somatotropin*). Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Mingzhan Xue, Qingwen Qian, Antonysunil A., Naila Rabbani, Roya Babaei-Jadidi, Paul J. T. 2008. *Activation of NF-E2-Related Factor-2 Reverses Biochemical Dysfunction of Endothelial Cells Induced by Hyperglycemia Linked to Vascular Disease.* Clinical Sciences Research Institute, Warwick Medical School, University of Warwick, University Hospital, Coventry, U.K.; and the Department of Biological Sciences, University of Essex, Central Campus, Wivenhoe Park, Colchester, Essex, U.K.
- Myres, P. dan Armitage, D. 2004. "*Rattus norvegicus*" Animal Diversity. http://http.www.animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_novergicus.htm [Diakses tanggal 21 Agustus 2017].
- Nugroho, W (2008). Keperawatan Gerontik & Geriatrik, Edisi-3. Jakarta:EGC
- Prabowo. 2002. Centella Anti Radang. Jakarta: PT Intisari Mediatama
- Pramono, S. 1992. Profil Kromatografi Ekstrak Herba Pegagan yang Berefek Antihipertensi. *Bul. Warta Tumbuhan Obat Indonesia* I(2): 37-39
- Pratama, A. Y., Aullani'am., dan M. C. Padaga. 2013. Gambaran Histopatologi dan Jumlah Mikroflora Jejunum Tikus Putih (*Rattus novergicus*) yang

Terpapar Indometasin dan Mendapat Suplementasi Bakteri Asam Laktat [Skripsi]. Malang : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.

Rahmawati, Ana. 2014. Mekanisme Terjadinya Inflamasi dan Stress Oksidatif Pada Obesitas. El-Hayah Vol. 5, No.1 September 2014. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Rajalakshmi, D dan S. Narasimhan. 1985. Food Antioxidants: Sources and Methods of Evaluation dalam D.L. Madhavi: Food Antioxidant, Technological, Toxicological and Health Perspectives. Marcel Dekker Inc., Hongkong: 76-77

Samson, E. Dan A. J. A, Unility. 2014. *Ekspresi Immunoglobulin A (Ig A) pada Usus Halus Tikus Putih (Rattus novvergicus)*. Seminar Nasional Basic Science VI FMIPA Universitas Padjajaran.

Sastroamidjojo, S. 1997. *Obat Asli Indonesia*. Jakarta: Dian Rakyat

Sikka SC. 2004. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology. J. Androl. 25(1): 5-18.

Sirois. 2005. Laboratory Animal Medicine: Principle and Procedures, Elsevier, USA

Soejono, C. H. 2004. Pasien Geriatri dan Permasalahannya. *Artikel Medika*. no. 5 tahun XXX, Mei 2004.

Soekaton U. Kesulitan Diagnostik pada Manusia. Simposium Masalah Manusia Lanjut Usia. Bandung 9-11 Desember 1985: 18-24

Sukmaningsih, A. Ermayanti, A. Wiratmini, N., dan Sudatri, W. Gangguan Spermatogenesis Setelah Pemberian Monosodium Glutamat pada Mencit (*Mus musculus L.*) *Jurnal Biologi* XV (2) : 49-52.

Suryohusodo. 2000. P. Oksidan, Antioksidan dan Radikal Bebas, dalam *Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekular*. Jakarta : CV. Infomedika : 31-47.

Susmiarsih T. Peran Genetik DNA Mitokondria (mtDNA) Pada Motilitas Spermatozoa. *Majalah Kesehatan PharmaMedika*, 2010 Vol,2, No,2. Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas YARSI. Jakarta

Sutardi. 2008. Kajian Waktu Panen dan Pemupukan Fosfor Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Asiatikosida Tanaman Pegagan (*Centella asiatica L. Urban*) di Dataran Tinggi. Tesis. Program Studi Agronomi, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor

- Sutardi.2016. Kandungan Bahan Aktif Tanaman Pegagan dan Khasiatnya Untuk Meningkatkan Sistem Imun Tubuh. Jurnal Litbang Pertanian Vol. 35: 121-130. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Yogyakarta
- Takashi, H. Tainaka, H. Umezawa, M. Takeda, K. Hiromitsu, T. 2011. Evaluation of Testicular Toxicology of Doxorubicin based on Microarray Analysis of Testicular Spesific Gene Expression. *Journal Natl Cancer Inst Monogr.* page 12-17.
- Mingzhan Xue, Qingwen Qian, Antonysunil Adaikalakoteswari, Naila Rabbani, Roya Babaei-Jadidi, and Paul J. Thornalley. 2008. *Activation of NF-E2-Related Factor-2 Reverses Biochemical Dysfunction of Endothelial Cells Induced by Hyperglycemia Linked to Vascular Disease*. 1Clinical Sciences Research Institute, Warwick Medical School, University of Warwick, University Hospital, Coventry, U.K.; and the 2Department of Biological Sciences, University of Essex, Central Campus, Wivenhoe Park, Colchester, Essex, U.K.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. 2007. Review: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Inter J Biochem Cell Biol.* 39:44-84.
- Wasilah, R. Dan Soedjono A. 2001. Tua dan Proses Menua. Berkala Ilmu Kedokteran Vol. 33, No.4. Yogyakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada
- Wardani, E. T. 2010. Pengaruh Ekstrak Jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) var. Gajah terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) yang Terpapar 2-Methoxythanol [Skripsi]. Surabaya : Universitas Airlangga Surabaya.
- Widayati, T. D. 2008. *Ilmu Reproduksi Ternak*. Yogyakarta : UGM Press.
- Winarno, F. G. 1997. Kimia Pangan dan Gizi. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama
- Wolfensohn, S. Dan Lloyd, M. 2013. Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, 4th ed. Wiley-Blackwell, West Sussex, 234.
- Zulkarnaen, Alifia Putri F, Oktavia Eka P. 2016. *Penetapan Kadar Asiatikosida Ekstrak Etanol 70 % Pegagan (Centella asiatica) menggunakan Metode LC-MS*. Program Studi Farmasi. Malang: Universitas Brawijaya.